

INDUCCIÓN DE PLASTICIDAD SINÁPTICA MEDIADA POR ESPIGAS DE CALCIO EN LA CORTEZA DE BARRILES DE RATA

Andrea Díez García

Universidad Autónoma de Madrid

ABREVIATURAS

AMPAR: receptor ionotrópico de glutamato

APV: D-aminophosphovalerate, bloqueador de receptores NMDA

BAPTA: 1,2-bis(o-aminophenoxy) ethane- N,N,N',N'-tetraacetic acid quelante de Ca^{2+}

CAMKII: proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina tipo 2

CCDV: canales de calcio dependientes de voltaje

EPSC: corriente excitatoria postsináptica

EPSP: potencial excitatorio postsináptico

GABA_AR: receptor ionotrópico de GABA (sensible al ácido gamma aminobutírico)

IP3: inositol trifosfato

IP3-KO: knock-out para IP3

LCA: líquido cefaloraquídeo artificial

LTP: potenciación a largo plazo (del inglés Long Term Potentiation)

LTD: depresión a largo plazo (del inglés Long Term Depression)

mAChR: receptor metabotrópico colinérgico

mGluR:receptor metabotrópico de glutamato

NMDAR: receptor ionotrópico de glutamato (sensible al ácido N-Metil-D-Aspártico)

PA: potencial de acción

PAR: potencial de acción retropropagado

PKA: proteína kinasa A

PKC: proteína kinasa C

STDP: Spike Timing Dependent Plasticity

I. INTRODUCCIÓN

1. El Sistema Somatosensorial

Los sistemas sensoriales consisten en redes neuronales que vinculan la periferia con la médula espinal, el tallo encefálico, el tálamo y la corteza cerebral. Estos sistemas son responsables de la percepción de los sentidos (vista, olfato, audición, gusto y tacto) y de la percepción del dolor. Son parte, asimismo, del sistema sensorial otras neuronas especializadas en la detección de modalidades sensoriales no conscientes como la presión arterial, el pH extracelular, la temperatura, la concentración de hormonas... (Cardinali, 1992).

El contacto con el mundo exterior ocurre a través de estructuras neurales especializadas llamadas receptores sensoriales. Un tema de permanente interés para la fisiología sensorial es establecer cuánto de lo que percibimos del mundo exterior es una realidad o una ilusión limitada por la funcionalidad de nuestros receptores sensoriales. Además de la percepción del mundo exterior es también la percepción de nuestro cuerpo, tanto de movimientos y posición corporal (propiocepción), como del estado visceral (presión arterial, distensión pulmonar... (interocepción). Se habla así de 3 categorías de percepción:

- Exterocepción, de naturaleza consciente.
- Propriocepción, con componentes tanto conscientes como inconscientes.
- Interocepción, de naturaleza inconsciente.



Existen principios generales de organización para todos los sistemas sensoriales, sea en su función, en la forma en la que se conectan con áreas cerebrales superiores, o en las reacciones que desencadenan.

En el esquema anterior se definen los diferentes niveles de organización desde el estímulo hasta la percepción (Fig.1). Los estímulos dan origen a potenciales graduados en los receptores sensoriales, los que a su vez producen excitación de las fibras sensoriales aferentes con la generación de trenes de potenciales de acción. La actividad de estas fibras aferentes es integrada en las áreas sensoriales centrales (procesado jerárquico) mediante la combinación de los diversos circuitos sinápticos. El primer signo subjetivo de que un estímulo ha ocurrido es la impresión sensorial. Por ejemplo, una luz de longitud de onda de 400 nm produce la impresión sensorial “azul”, (Cardinali, 1992).

1.1 Procesamiento de la información somatosensorial

Los sistemas sensoriales traducen y dan una continuidad a la representación externa del medio para que sea comprensible para el organismo. Esta tarea plantea dos dificultades fundamentales: es mucha la información por procesar y limitada la capacidad de una sola neurona para hacerlo. Los sistemas sensoriales resuelven el problema dividiendo cada evento sensorial en modalidades específicas que son conducidas por vías concretas para cada una de las modalidades (Hendry y cols, 1999).

Cada neurona sensorial posee un campo receptivo. El campo receptivo es definido fisiológicamente como una región corporal que, cuando se estimula con un estímulo apropiado, produce un cambio en la actividad de la neurona (Mountcastle, 1997). Esta definición es aplicable tanto a receptores periféricos como a neuronas del sistema nervioso central (SNC). Generalmente los campos receptivos de cada sistema sensorial tienden a hacerse más amplios y más complejos según se asciende a niveles superiores del SNC, es decir, según se asciende a niveles superiores convergen en una neurona la información de un grupo de receptores cada vez mayor (Hendry y cols, 1999).

El sistema somatosensorial se caracteriza en que provee al SNC de información acerca del estado externo e interno del cuerpo y permite, además, la coordinación

motora. Este sistema es, por tanto, el sustrato anatómico y fisiológico de la percepción de los estímulos somáticos y su localización en el cuerpo. Se distinguen cuatro modalidades somestésicas: tacto, propiocepción, nocicepción y sensación térmica. El tacto es la modalidad que permite percibir los estímulos mecánicos que producen deformaciones de la piel y no producen daño a nuestro organismo. La propiocepción nos permite conocer en todo momento la posición de la musculatura voluntaria y sistemas tendinosos así como su estado de contractilidad, consiguiendo así informar con precisión de la postura del cuerpo al SNC. La nocicepción codifica estímulos que pueden provocar lesión a nuestro organismo como son las quemaduras o las incisiones. Por último, la sensación térmica determina los niveles de frío y calor (Burguess y Perl, 1973; Johnson y Hsiao, 1992; Gardner y cols, 2000). La percepción somestésica proviene de la activación de una variedad de receptores periféricos distribuidos en la piel, los músculos y las paredes viscerales (Burguess y Perl, 1973).

1.2 Receptores somatosensoriales

Para hacer posible la percepción de estas sensaciones, el sistema somestésico utiliza la información que generan los distintos tipos de receptores somatosensoriales que funcionan como transductores de energía y los convierte en potenciales de acción que se transmiten por el sistema nervioso. Al igual que los demás sistemas sensoriales, el sistema somatosensorial codifica cuatro atributos fundamentales del estímulo: la modalidad, la localización, la intensidad y el tiempo en el que transcurre dicho estímulo (Adrian y Zotterman, 1926).

Los receptores somatosensoriales son terminales de la prolongación periférica de las neuronas primarias, cuyos cuerpos celulares se encuentran situados en el ganglio de la raíz dorsal o en el ganglio del trigémino. Los terminales sensoriales de los nociceptores y los termoreceptores son terminaciones nerviosas libres que o bien son amielínicos o bien están escasamente mielinizados. Los terminales sensoriales de los mecanoreceptores están asociados con estructuras o con células capaces de detectar deformaciones de la piel y cuyas fibras están mielinizadas (Gasser, 1941; Hensel, 1973).

Los receptores cutáneos del tacto suelen clasificarse en cuanto a su morfología. Existen cuatro tipos principales de mecanoreceptores: los receptores de Merkel, de Paccini, de Ruffini y de Meissner (Gasser, 1941). Las distintas submodalidades del tacto se codifican dependiendo del mecanoreceptor activado. La presión activa los

receptores de Merkel y de Ruffini mientras que la vibración activa los receptores de Meissner y Pacini (Talbot y cols, 1968). La localización del estímulo se codifica en función de la distribución de los receptores activados; cada receptor responderá con un potencial de acción sólo cuando es estimulado con su estímulo específico, siendo los receptores de Meissner y de Merkel los que proveen de la mayor precisión en cuanto a la localización del estímulo (Adrian y Zotterman, 1926). La intensidad del estímulo se codifica en función de la tasa de disparo de los potenciales de acción de cada receptor, y la duración de la estimulación se codifica por el tiempo en que se mantiene disparando potenciales de acción el receptor (receptores de adaptación lenta) o porque disparan al principio y al final de la estimulación (receptores de adaptación rápida) (Vallbo y cols, 1984).

1.3 Corteza cerebral. Corteza de barriles

La corteza cerebral es el sustrato del pensamiento. Más que cualquier otra parte del

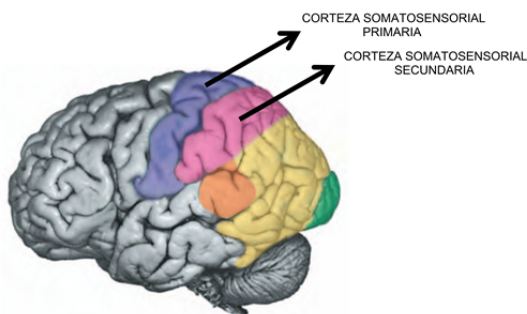


Figura2. Esquema que muestra la localización de la corteza somatosensorial primaria y áreas asociativas en la corteza cerebral humana.

sistema nervioso, constituye el asiento de las funciones intelectuales que nos dotan del carácter humano y hacen de cada uno de nosotros un individuo único. Estas funciones intelectuales comprenden la capacidad para utilizar el lenguaje y la lógica, y para ejercitar la imaginación y el entendimiento (Haines, 2006).

Las áreas sensoriales primarias del neocórtex (visual, somatosensorial, acústica) reciben sus principales aferentes corticales de los correspondientes órganos sensoriales a través de estaciones de relevo en núcleos talámicos específicos (fibras talamocorticales). Además de estas fibras aferentes específicas, la corteza cerebral recibe otro tipo de fibras procedentes de la propia corteza (fibras de asociación corticocorticales y callosas), así como de otros núcleos talámicos y, por supuesto, de otros centros subcorticales (Valverde, 2002). Las conexiones eferentes de una región determinada de la corteza incluyen: fibras de proyección, hacia las estructuras subcorticales (como son las proyecciones corticotálamicas), fibras callosas (hacia la corteza del hemisferio opuesto) y fibras de asociación (hacia la corteza del mismo hemisferio) (Haines, 2006). El modelo básico de conectividad intracortical comúnmente aceptado, que puede extenderse a todas las áreas de recepción primaria (somatosensorial, auditiva y visual), en resumen sigue

este esquema: la entrada principal (fibras aferentes de los núcleos talámicos específicos) se realiza sobre la capa IV; las neuronas de esta capa proyectan fundamentalmente sobre capas II y III; éstas últimas lo hacen sobre capa V, la que a su vez, lo hace sobre la capa VI, y finalmente, las capas V y VI proyectan a las capas II y III y a la capa IV respectivamente (Valverde, 2002).

Desde el sentido del olfato hasta el de la visión, cada modalidad sensorial posee su propio territorio **cortical**, el cual mantiene una localización más o menos parecida en todos los mamíferos. Éstas áreas son las llamadas áreas somáticas primarias y aparte existen áreas somáticas secundarias, de asociación y motoras (Fig. 2). En conjunto todas las áreas implicadas elaboran finalmente la respuesta compleja de aprendizaje, memoria y comportamiento (Valverde, 2002). Los estudios de la corteza cerebral comenzaron con Maynert en 1869 y Betz en 1874, quienes establecieron que la corteza cerebral se organizaba por capas. Fue en 1878 cuando Bevan Lewis dijo que se trataba de un estratificado de seis capas diferentes, lo cual se mantiene hasta la actualidad. La corteza cerebral ha sido dividida en 2 tipos fundamentales: el isocortex y el allocortex (Brodmann y cols, 1909). El isocortex o neocorteza es la parte de la corteza cerebral en la que siempre se pueden observar las seis capas, mientras que el allocortex o arquicorteza son las que se componen de una estructura laminar compuesta por tres capas, y corresponden al hipocampo y corteza olfativa (Sanides, 1970).

Fue precisamente Ramón y Cajal quien realizó una descripción completa de la organización de la corteza cerebral del hombre y vertebrados, mostrando la estructura y conexiones de los distintos tipos neuronales, su organización dendrítica y axonal, y la disposición de los plexos de fibras aferentes y eferentes (Ramón y Cajal, 1911), las seis capas de la neocorteza son:

- La capa molecular ó I: contiene pocos cuerpos neuronales.
- Las capas II y III: contienen células granulares y piramidales de tamaño pequeño y mediano. Las fibras aferentes de asociación corticocorticales y callosas terminan prácticamente en todas las áreas y capas corticales, aunque especialmente se han descrito más abundantes en las capas II/III (Valverde, 2002).
- La capa IV: está casi exclusivamente formada por células granulares más grandes, que son las principales receptoras de las aferencias corticales procedentes del tálamo.

Es la capa que aloja los barriles en la corteza somatosensorial, por lo que está especialmente desarrollada.

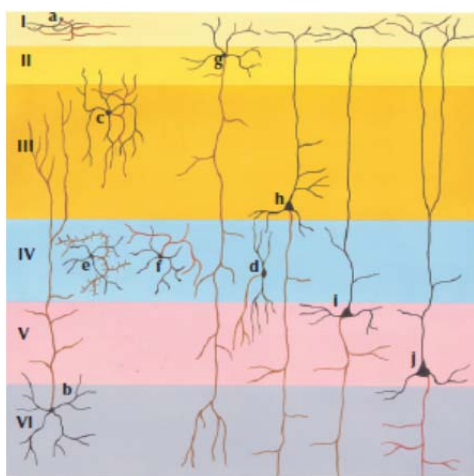


Figura 3. Representación gráfica de los principales tipos neuronales de las distintas capas de la corteza cerebral

-La capa V: piramidal interna, está formada por neuronas piramidales de tamaño más grande y es la principal capa de proyección. Principalmente desde la capa V, la corteza de barriles establece numerosas conexiones cortico-corticales con distintas áreas incluyendo la corteza motora primaria (M1), la corteza somatosensorial secundaria (S2), la región ventral de la corteza parietal posterior y a la corteza de barriles contralateral, a través del cuerpo calloso. También proyecta a diversas estructuras subcorticales entre las que se encuentran el neocórtico, el puente y el colículo superior, además de otros núcleos del tronco del

encéfalo y del tálamo (Hoeflinger y cols, 1995; Veinante y cols, 2000; Hoffer y cols, 2005; Petersen, 2007).

-La capa VI ó multiforme: se compone de diversos tipos neuronales.

Las áreas primarias de la neocórtex (visual, somatosensorial, acústica) reciben sus principales aferencias corticales de los correspondientes órganos sensoriales a través de estaciones de relevo en núcleos talámicos específicos, son las que se conocen como *aferentes corticales específicos*. Además de éstas fibras aferentes también la corteza recibe otro tipo de fibra procedente de la propia corteza (fibras de asociación corticocorticales y callosas), así como de otros núcleos talámicos y, por supuesto de otros centros subcorticales, éstas son conocidas como las *aferentes inespecíficos* (Lorente de Nó, 1949). Estas fibras inervan varias áreas corticales donde se distribuyen en varias capas corticales. Las fibras de asociación corticocorticales y callosas terminan prácticamente en todas las áreas y capas corticales (de Felipe y Fariñas, 1992).

En los roedores existe una zona en esta corteza somatosensorial llamada **corteza de barriles**. La corteza de barriles, como parte de la corteza somatosensorial primaria (S1), es una estructura de gran importancia en la percepción somestésica de la mayor parte de los roedores, ya que esta estructura cortical recibe y procesa información

procedente de las vibrisas, que constituyen el elemento sensorial táctil más especializado de los roedores. La citoarquitectura de la corteza de barriles se caracteriza por su disposición en capas, al igual que el resto de la neocorteza (Haines, 2006; Fox, 2008). Los barriles de S1 son la especialización más destacada del sistema sensorial de los roedores (Fox, 2008). En S1 existe un mapa somatotópico de las vibrisas (Fig. 4) del animal en el que se representan individualmente por poblaciones

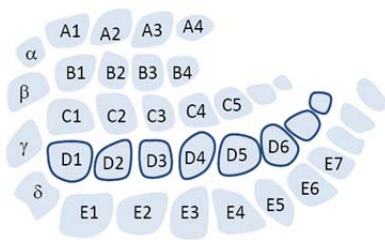
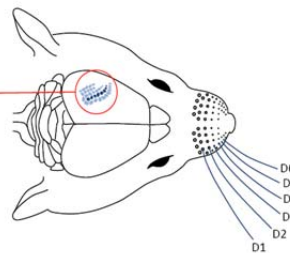


Figura 4. Representación gráfica de la somatotopía del sistema somatosensorial. Se representa a la drcha las vibrisas y a la izqda los barriles de la corteza somatosensorial.



neuronales diferenciadas. Es decir, cada vibrisa está representada en la capa IV por una estructura anatómica, discreta y definida como un módulo columnar; el barril, que

permite delimitar de forma precisa la organización funcional de las vibrisas (Woolsey y Van der Loos, 1970). Cada barril consecutivo está separado del siguiente por una región más estrecha llamada septa en la que sus neuronas no están definidas por una

vibrisa específica, si no que se activan por varias de ellas (Woolsey y Van der Loos, 1970; Petersen, 2007; Alloway, 2008). Desde la periferia hasta la neocorteza los circuitos del sistema somatosensorial están topográficamente organizados en cada estación de relevo (Pouchelon y cols, 2012). La información sensorial periférica se transmite a través de los nervios de las vibrisas desde los folículos de la región mistacial del roedor, hacia el tálamo contralateral, siguiendo vías lemniscales y paralemniscales. En la vía lemniscal, las neuronas sensoriales establecen sinapsis excitadoras en el núcleo sensitivo principal del trigémino (PrV) en el tronco del encéfalo y proyectan al núcleo ventral posteromedial (VPM) del tálamo. Las neuronas del PrV están dispuestas somatotópicamente y organizadas en “barriletes”, en el que cada uno recibe aferencias de una única vibrisa (Veinante y cols, 2000; Petersen, 2007, Pouchelon, 2012). En el VPM también existen unidades anatómicas somatotópicamente organizadas llamadas “barreloides” (Petersen, 2007). Por el contrario, la vía paralemniscal se origina en la zona rostral en la porción interpolar del núcleo sensitivo espinal del trigémino (SpVi), a nivel del tronco del encéfalo y proyecta a la porción medial del grupo posterior del tálamo (POm) y a una fina región en la porción ventrolateral del VPM (Veinante y cols, 2000; Petersen, 2007). El SpVi también se encuentra organizado en barriletes (Petersen, 2007; Pouchelon, 2012). Dado que las vías lemniscal y paralemniscal son las mejor caracterizadas, ha sido posible

identificar de manera precisa la distribución de las aferencias sensoriales así como la representación del patrón de vibrisas en las distintas porciones de los núcleos del par craneal trigémino en el tronco del encéfalo. Dentro de la corteza somatosensorial, las aferencias del tálamo proyectan en sentido horizontal en el límite entre las capas IV y V, dónde se ramifican profundamente dentro de los barriles estableciendo un gran número de contactos sinápticos (Fox, 2008).

Las proyecciones tálamo-corticales de las vías lemniscal y paralemniscal terminan en partes separadas de la corteza de barriles de S1. Por un lado, los barriles ubicados en la capa IV reciben la mayor aferencia talámica, procedente del VPM (Lu y cols, 1993). Por otro, las regiones septales reciben aferencias desde el POm y la fina región del VPM (Lu y cols, 1993). A pesar de que la diana principal de las neuronas del VPM sean los barriles de capa IV, también existe una inervación, aunque débil, de la capa VI (Petersen, 2007). El VPM también envía proyecciones menos abundantes a regiones adyacentes de la capa VI, Vb y porciones bajas de la capa III, mientras que las proyecciones del POm son, principalmente, a capas I y V, aunque también a II y III de S1 así como a S2 y M1.

A nivel intracortical, a pesar de que los barriles están claramente definidos en la capa IV, las neuronas que se localizan en el resto de capas directamente superiores e inferiores a la capa IV, se activan mejor por la misma vibrisa que activa las neuronas del barril (Welker, 1976; Simons, 1978; Alloway, 2008). Existen conexiones recíprocas dentro de los barriles entre las neuronas de las capas II-III y V y entre las neuronas de las capas IV y VI (Fox, 2008).

La corteza de barriles constituye una estructura de especial relevancia en la fisiología del sistema nervioso central de los roedores, por lo que la caracterización específica de las vías que componen el sistema somatosensorial, y específicamente de la corteza de barriles, permitirá estudiar sus propiedades tanto funcionales como disfuncionales.

1.4 Propiedades electrofisiológicas de las neuronas piramidales

Las neuronas corticales tienen unas características electrofisiológicas heterogéneas que suelen correlacionar con sus características morfológicas, con el tipo de conexiones que establecen y con el tipo de neurotransmisor que contienen

(Connors y Gutnick, 1990; McCormick y cols, 1985). Estudios de distintas áreas de la neocorteza realizados en distintas especies sugieren que las neuronas pueden clasificarse en cuatro subtipos principales de acuerdo con sus características electrofisiológicas: neuronas que disparan espigas de sodio de forma regular, neuronas que disparan espigas en ráfagas, neuronas que disparan espigas de corta duración y las neuronas que tienen un disparo tónico (Connors y Gutnick, 1990; Silva y cols, 1991):

- Estudios electrofisiológicos de registros extracelulares *in vivo* y registros intracelulares *in vitro* describen que un gran número de neuronas de la neocorteza disparan espigas de forma regular. Al aplicarles un pulso de corriente despolarizante responden con trenes de potenciales de acción (Connors y Gutnick, 1990). Este tren de potenciales de acción va disminuyendo su frecuencia de descarga, proceso que se conoce como adaptación de la frecuencia de disparo (McCormick y cols, 1985; Madison y Nicoll, 1984). Estas neuronas se han encontrado entre las capas II y VI de la corteza cerebral y suelen ser piramidales aunque también se ha descrito que las neuronas estrelladas con espinas de la capa IV también podrían disparar de esta manera (Connors y Gutnick, 1990; McCormick y cols, 1985).

- Las neuronas que disparan en ráfagas son piramidales y cuando se les aplica una corriente despolarizante generan una ráfaga de 3 a 5 potenciales de acción de Na^+ (Chagnac-Amitai y cols, 1990; McCormick y cols, 1985). Las neuronas de la corteza que disparan en ráfagas son similares a las encontradas en las neuronas piramidales de CA3 del hipocampo (Prince y Connors, 1986; Wong y Price, 1978; Núñez y cols, 1990). Este tipo de neuronas se han descrito en distintas áreas corticales tales como las áreas de la corteza cingulada, en las áreas sensorio-motoras y en las áreas visuales del cobaya y de la rata. Generalmente se han encontrado en la capa V y poseen una dendrita apical que sube hasta la capa I donde se bifurca (Chagnac-Amitai y cols, 1990). Los axones de estas neuronas realizan conexiones en las capas V y VI, presentan un aspecto similar a las neuronas que proyectan a regiones subcorticales (Huberner y cols, 1990). Según los datos obtenidos en *in vitro* estas neuronas reciben menos entradas inhibitorias que las neuronas de disparo regular de la misma capa (Chagnac-Amitai y Connors, 1989), lo que podría indicar que estas neuronas no sólo amplifican las entradas sinápticas generando ráfagas de potenciales de acción sino que serían más sensibles a dichas entradas por la falta de control inhibitorio (Chagnac-Amitai y cols, 1990).

- Las neuronas con espigas de corta duración se caracterizan por una alta tasa de disparo (> 250 Hz), por apenas tener una adaptación de la frecuencia de disparo durante la inyección de pulsos de corriente despolarizante de larga duración, y por responder a la estimulación de las vías aferentes con un tren de potenciales de acción de alta frecuencia (McCormick y cols, 1985). La corta duración de los potenciales de acción se debe a una rápida repolarización de cada espiga que implica la participación de corrientes de K^+ (McCormick y cols, 1985; Hamill y cols, 1991). Estudios con inyecciones de colorante han mostrado que las dendritas de estas neuronas no tienen espinas o tienen pocas espinas por lo que parece que se trata de interneuronas GABAérgicas (McCormick y cols, 1985).

- Las neuronas de disparo tónico se han encontrado en neuronas piramidales de la capa V en la corteza sensorimotora de la rata. Estas neuronas se caracterizan por generar trenes de potenciales de acción cuya frecuencia de disparo muestra poca adaptación y por ser capaces de oscilar de forma endógena a una frecuencia de entre 5 a 12 Hz (Silva y cols, 1991). La oscilación intrínseca depende de la activación de corrientes de Na^+ y puede sincronizarse con la oscilación de otras neuronas piramidales de la capa V de la corteza mediante conexiones corticocorticales (Silva y cols, 1991).

Cada una de estos tipos de neuronas corticales responden de manera diferente a potenciales hiperpolarizantes, depolarizantes y a potenciales postsinápticos. La adaptación de la frecuencia de disparo varía de neurona a neurona y probablemente sea dependiente de la acción combinada de los neurotransmisores que bloquean las corrientes que subyacen a sus patrones de disparo (McCormick, 1992).

2. Neuronas Piramidales y espigas de calcio

Se han encontrado en muchas regiones del SNC estas neuronas piramidales y aunque aún no se sepa bien la razón de su abundancia se han estudiado especialmente las piramidales de CA1 en el hipocampo y en la capa V de la neocorteza. Estos estudios han ofrecido gran información de la estructura y función de éstas células. No todas las neuronas piramidales son idénticas, pero algunos de los principios funcionales comunes se han podido identificar. En particular, la existencia de dominios dendríticos de entradas sinápticas, la excitabilidad, la modulación y la plasticidad parecen ser características comunes que permiten que las sinapsis

distribuidas a lo largo de todo el árbol dendrítico contribuyan a la generación de potenciales de acción. Éstas propiedades apoyan una variedad de mecanismos de detección y coincidencia, lo cual es probable que sea crucial para la integración y la plasticidad sináptica, (Spruston, 2008).

Las neuronas piramidales son muy abundantes en la corteza cerebral de todos los mamíferos que se han estudiado (Elston, 2003), al igual que en pájaros, peces y reptiles, pero no en anfibios (Nieuwenhuys, 1994), sugiriendo que ha sido una estructura muy preservada. Las neuronas piramidales han sido encontradas en mamíferos en el prosencéfalo: corteza cerebral, hipocampo y amígdala, pero no se han encontrado en el bulbo olfatorio, el mesencéfalo, el romboencéfalo ni en la médula espinal (Ramón y Cajal, 1995). Con lo cual, estas neuronas se encuentran en estructuras que están asociadas con funciones cognitivas avanzadas, y el entendimiento de estas neuronas es necesario para comprender como realizan estas funciones complejas (Spruston, 2008).

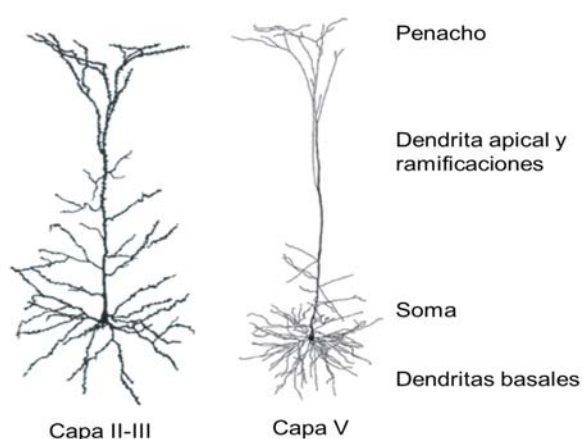


Figura 5. Estructura de neuronas piramidales corticales. Estructura de las neuronas piramidales de la capa II/III y de la capa V. Las piramidales de capa V tienen la dendrita apical más larga y con menos dendritas apicales oblicuas que las de capa II/III, (Spruston, 2008).

Las **neuronas piramidales corticales** tienen un único axón, que nace de la base del soma, se ramifica dando colaterales, abandona la corteza y atraviesa la sustancia blanca subcortical, estableciendo contactos sinápticos excitadores, de tipo glutamatérgico a lo largo de toda su extensión. El árbol dendrítico de las neuronas piramidales está compuesto por dos dominios: una larga dendrita apical y las dendritas basales, que descienden desde la base del soma y siguen una dirección predominantemente horizontal (Fig.

5). La dendrita apical asciende desde el soma hacia las capas más superficiales de la corteza donde se ramifica y forma terminaciones en penacho a una distancia más o menos variable del soma (Spruston, 2008). En algunos casos las dendritas apicales se van ramificando cada vez más y las dendritas oblicuas emanan de la dendrita apical principal en varios diferentes ángulos (Bannister y Larkman, 1995).

Aunque todas estas características son comunes a las neuronas piramidales, éstas pueden variar considerablemente entre diferentes especies, regiones corticales y capas (de Felipe y Farinas, 1992; Kasper y cols, 1994; Gao y cols, 2004).

Las neuronas piramidales reciben entradas sinápticas a nivel del soma, del axón y de las dendritas. El soma y el axón reciben las entradas inhibitorias GABAérgicas, mientras que la mayoría de las entradas excitatorias llegan a nivel de las dendritas. Normalmente las dendritas proximales al soma reciben las entradas excitadoras locales (Colaterales en el mismo área o área adyacente), mientras que las dendritas distales reciben entradas sinápticas desde áreas corticales más lejanas y áreas talámicas. Esto es importante para poder estudiar cómo se integran las entradas de diferentes dominios. Las distintas morfologías de las dendritas basales y apicales sugiere que la información que llega a esos dominios se integra de manera diferente (Cauler y Connors, 1994).



Figura 6. Espinas dendríticas. Dibujo de espinas dendríticas teñidas de azul de metileno de neuronas piramidales corticales (Cajal, 1896).

Las neuronas piramidales están cubiertas por miles de **espinas dendríticas** (Fig. 6), las cuales constituyen el sitio postsináptico donde se realizan la mayoría de las sinapsis excitadoras glutamatérgicas. El número de espinas representa el número mínimo estimado de sinapsis excitadoras que llegan a la neurona, lo cual varía considerablemente en las diferentes regiones y especies (Elston y de Felipe, 2002). Las espinas varían considerablemente en tamaño y forma y son altamente plásticas, cambiando de forma y de tamaño. Así la activación de pequeñas espinas pueden conducir a un incremento del tamaño de la espina y de la respuesta al glutamato (Matsuzaki y col, 2004). En experimentos en cultivo y en rodajas se ha visto que las espinas son dinámicas (Bonhoeffer y Yuste, 2002), pero es poco conocido cómo ocurre esto in-vivo. Aunque es difícil el estudio de la dinámica de las espinas en condiciones normales, hay evidencias que indican que existen dos poblaciones diferentes de espinas; una es más estable y la otra es más plástica, pudiendo cambiar las dos con la experiencia (Holtmaat, 2005). Se ha sugerido que las espinas más dinámicas podrían estar contribuyendo al aprendizaje y las más estables podrían estar involucradas en memorias establecidas (Kasai y cols, 2003; Bourne y Harris, 2007).

La activación repetitiva de pequeñas espinas pueden conducir a un incremento del tamaño de la espina y de la respuesta al glutamato (Matsuzaki y cols, 2004).

La integración sináptica depende de la distancia. En gran medida la integración de las entradas sinápticas excitadoras se ve influenciada por la localización de las sinapsis en la dendrita. Las sinapsis que distan del soma tendrán menor influencia sobre la iniciación de potenciales de acción en el axón debido a la pérdida de carga de la corriente que fluye desde las dendritas al soma y al axón (Spruston y cols, 1994). Debido a que las sinapsis se forman a diferentes distancias del soma, el potencial sináptico excitador resultante (EPSP) es dependiente de la localización de cada sinapsis, como ya predecía la teoría del cable (Rall, 1967). Algunas sinapsis podrían ser capaces de compensar su conductancia con el fin de normalizar su influencia somática (Williams y Stuart, 2000). Evidencias de esta "escala sináptica" ha sido identificada en algunas, pero no en todas las sinapsis de CA1, estando ausentes en la sinapsis de las neuronas piramidales en capa V. Sinapsis distales podrían ejercer influencia significativa sobre la iniciación del AP a través de la activación de canales voltaje dependientes, los cuales pueden mejorar la carga en la sinapsis distal y podrían incluso dar lugar a la iniciación de espigas dendríticas (Citri y Malenka, 2008).

Distintas poblaciones de interneuronas GABAérgicas dirigen sus proyecciones a distintos dominios en las neuronas piramidales (Kawaguchi y Kondo, 2002; Somogyi y Klausberger, 2005). Diferentes interneuronas tienen distintas focalizaciones sobre la neurona piramidal, pero normalmente son selectivas, para el axón, el soma o dominios dendríticos selectivos. Esto es importante para entender como la inhibición afecta en la integración sináptica. Es diferente si la interneurona inhibe a la piramidal mediante acción directa (mediante la misma sinapsis que están excitando a las neuronas piramidales) o por retroalimentación (mediante el disparo de otras neuronas piramidales). Mediante la acción directa las interneuronas pueden limitar la excitación de las neuronas piramidales incluso cuando no están disparando. Esto es un aspecto importante para determinar la ventana temporal en la suma de las entradas excitadoras. Por el contrario, la inhibición por retroalimentación sólo se activa cuando disparan las piramidales de la red neuronal, y esto limita sustancialmente el disparo de las neuronas piramidales. Existen dos tipos de inhibición por retroalimentación; inhibición transitoria, la cual se activa y cesa rápidamente, y la inhibición tardía y persistente, la cual tarda más en desarrollarse pero es sostenida en el tiempo. Normalmente la inhibición transitoria se da a nivel del axón o dendritas proximales y la

inhibición tardía se da a nivel de las dendritas distales. El impacto de las sinapsis inhibitorias en el soma por ejemplo no se transmite a las dendritas, sugiriendo que las sinapsis inhibitorias podrían ser locales (Andrasfalvy y Mody, 2006). La inhibición a nivel de las dendritas limita la generación de espigas de calcio en las células piramidales. En neuronas de la neocorteza esta inhibición ocurre a través de proteínas G acopladas a canales de calcio en las dendritas (Perez-Garci y cols, 2006).

En las neuronas piramidales es muy importante la presencia de **canales activados por voltaje**, ya que influyen en las propiedades intrínsecas de la neurona; el umbral para el potencial de acción, la hiperpolarización que sigue al potencial de acción (AHP), la despolarización siguiente (ADP) y en el modo en el que dispara la neurona (su patrón de disparo). Así, algunas responden a una inyección de corriente con un patrón regular de disparo (regular-spiking, RS) y otras que disparan como un estallido o ráfaga de potenciales de acción (burst-spiking, BS), (Connors y Gutnick, 1990). Los potenciales de acción en las células piramidales van seguidos por un ADP (Wong y Prince, 1981), lo cual es mediado por canales de Na^+ y/o Ca^{2+} voltaje dependientes pero también requieren canales de K^+ para una rápida repolarización. Las variaciones en la amplitud de la ADP contribuye a la diferenciación entre éstos dos tipos de neuronas piramidales (Metz y cols, 2005). Los canales dendríticos también pueden influir en las propiedades de disparo de las neuronas por proveer corrientes adicionales en la zona de iniciación del potencial de acción. Además los canales iónicos presentes en las dendritas probablemente tengan un gran efecto en el axón y en el soma participando en la generación y propagación de las espigas de calcio (Schwartzkroin, 1977).

Los canales voltaje dependientes intervienen en la integración sináptica. La distribución de éstos canales puede ser uniforme o no dependiendo del tipo celular. En el caso de las piramidales de capa V, los canales de Na^+ se distribuyen de manera uniforme y los de K^+ también (Bekkers, 2000; Korngreen, 2000). La función más importante de los canales dendríticos de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , podría ser apoyo a la propagación retrógrada del potencial de acción y a la generación de espigas dendríticas (Stuart y cols, 1997).

2.1 Espigas de Calcio en las neuronas piramidales

La activación de canales de Na^+ y de Ca^{2+} pueden dar lugar a espigas dendríticas. Las espigas rápidas y breves están mediadas por flujo de Na^+ , aunque también tienen un flujo de calcio asociado. Sin embargo existen espigas más amplias y lentas mediadas por un flujo de Ca^{2+} denominadas espigas de Ca^{2+} (Fig. 7) (Spruston y cols, 1997; Golding y cols, 1999).

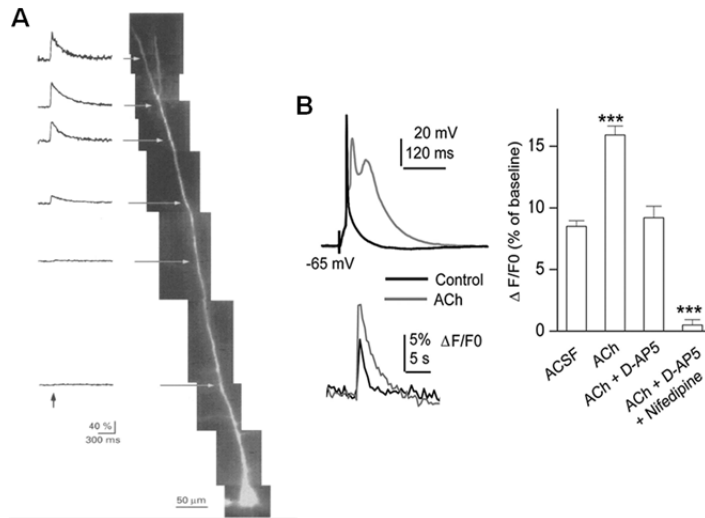


Figura 7. Espigas de Ca^{2+} en las neuronas piramidales corticales de la capa V. **A.** Imagen de fluorescencia de una neurona piramidal de la capa V de la corteza somatomotora llenada con Ca^{2+} -Green-1 (100 μm). En la parte izquierda, se muestran las espigas de Ca^{2+} generadas por estimulación sináptica distal (flecha negra), subumbral en el soma, a lo largo de las distintas localizaciones de la dendrita apical. La señal de fluorescencia de la corriente de Ca^{2+} en cada región dendrítica se representa en porcentaje. La amplitud de la espiga de Ca^{2+} disminuye a medida que se aproxima al soma hasta que la señal es prácticamente indetectable en la porción proximal al soma de la dendrita apical. [Schiller y cols., 1997] **B. Dcha.** Las espigas de cinética más lenta se sincronizan con una intensa señal de Ca^{2+} . En los trazos superiores se representan registros electrofisiológicos simultáneos a registros de la señal de Ca^{2+} (trazos inferiores expresados como el cambio relativo en % de la señal fluorescente de Ca^{2+}) en una neurona piramidal de la capa V de la corteza de barriles. El trazo negro superior representa, en una condición control, un EPSP junto con un único potencial de acción sincronizado a una pequeña señal de Ca^{2+} (trazo negro inferior) frente a la aplicación de ACh con la que se genera un EPSP junto con una espiga de cinética lenta (trazo gris superior) simultánea a una intensa señal de Ca^{2+} (trazo gris inferior). **Izda.** Las espigas de Ca^{2+} dependen de la activación de receptores NMDA (que se bloquean con D-AP5) y CCDVs (que se bloquean con nifedipina). [B-C:Núñez y cols., 2012]

Otro tipo de espigas dendríticas son las espigas de NMDA, éstas espigas son mediadas por la activación regenerativa de los receptores de glutamato de tipo NMDA (NMDARs) como resultado de la liberación del bloqueo por Mg^{2+} que bloquea a estos canales (Schiller y cols, 2000). Las espigas de NMDA se han observado en las dendritas basales pero no en las apicales, sin embargo, estas espigas no pueden propagarse más allá de la región dendrítica donde ha ocurrido la liberación de glutamato (Schiller y Schiller, 2001). En las dendritas basales también se observan espigas de Na^+ pero no espigas de Ca^{2+} , lo cual sugiere que la excitabilidad de las dendritas basales podría ser diferente que la de las dendritas apicales.

La aplicación directa de glutamato sobre las dendritas de las neuronas piramidales puede producir espigas rápidas y espigas más lentas y amplias, las cuales serán

probablemente mediadas por una combinación de la activación de canales de Na^+ , de canales de Ca^{2+} y de NMDARs (Schwindt y Crill, 1997; Oakley y cols, 2001). Una vez iniciadas, las espigas dendríticas se propagan hacia el soma, donde en algunos casos pueden iniciar el potencial de acción (Stuart y cols, 1997), pero muchas veces se observan fallos en la propagación de las espigas dendríticas (Gasparini, 2004). La propagación hacia el soma de las espigas dendríticas es menos fiable que la retropropagación. Esto es debido a que las despolarizaciones generadas en espinas pequeñas no siempre llegan a despolarizar zonas de la membrana de mayor tamaño como en el cono axónico de iniciación del PA (Vetter y cols, 2001). Estas variaciones de potencial a las que llamamos espigas de calcio, tienen un carácter todo o nada y, además, presentan una cinética más lenta que los potenciales de acción, mediados principalmente por conductancias de Na^+ y cinéticamente más rápidos (Fig. 5). (Schiller y cols, 1997; Larkum y cols, 2001; Nevian y Sakmann, 2004; Remy y Spruston, 2007; Núñez y cols, 2012).

En las primeras ramificaciones distales de la dendrita apical hay una gran densidad de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDVs), lo que provoca que esta región presente un umbral más bajo para generar espigas de Ca^{2+} (Larkum y cols, 2002). De esta manera, existe una zona de bajo umbral, con una gran densidad de CCDVs, en el penacho primario de la dendrita apical para la generación de espigas de Ca^{2+} , que se propagan tanto hacia el soma como lejos de él hacia las puntas más distales de las ramificaciones de las dendritas. Esta zona de bajo umbral para la generación de espigas de Ca^{2+} está situada en la dendrita apical a $\sim 550 - 900 \mu\text{m}$ del soma (Larkum y cols, 2002).

La generación de estas espigas de Ca^{2+} también está controlada por la inhibición local, ya que se facilita su inducción cuando la transmisión inhibitoria se bloquea con picrotoxina (PTX) un inhibidor de los receptores GABA_A . En este contexto, cuando la inhibición sináptica disminuye, se facilita la propagación retrógrada de los potenciales despolarizantes a través de las dendritas, aumentando así la probabilidad de generar espigas de Ca^{2+} . Puesto que neuromodulares como la acetilcolina (ACh) modulan en la transmisión sináptica inhibitoria, los mecanismos colinérgicos van a disminuir la transmisión GABA_A y a facilitar la generación de espigas de Ca^{2+} (Núñez y cols, 2012). Aplicando ACh de forma local en las dendritas basales de neuronas piramidales de la capa Vb de la corteza de barriles, es posible generar espigas de Ca^{2+} a través de la activación de NMDARs y CCDVs de tipo L (Fig. 4B) (Núñez y cols, 2012).

Las espigas de Ca^{2+} desempeñan varias funciones en las neuronas piramidales de la corteza cerebral. Una de ellas consiste en la amplificación de los potenciales postsinápticos que tienen lugar en las dendritas (Schiller y cols, 1997). Esta misma capacidad que tienen los canales dependientes de voltaje va a depender del grado de la despolarización sináptica. Para alcanzar una amplitud del potencial postsináptico de aproximadamente -20 mV que permita activar CCDVs y observar un incremento de Ca^{2+} suficiente, será necesario reclutar un número determinado de contactos sinápticos activados y considerar tanto su grado de sincronización, como la parte del árbol dendrítico en que se localizan los contactos sinápticos (Schiller y cols, 1997). La generación de espigas de Ca^{2+} podría favorecer la amplificación de los potenciales postsinápticos que resultan de las aferencias intracorticales que inervan principalmente las ramas más distales de la dendrita apical de las neuronas piramidales de la capa V (Pouchelon y cols, 2012), por lo que van a desempeñar un papel importante en el procesamiento de información sensitiva. Puesto que el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} es un elemento crucial en la plasticidad sináptica, como se explica posteriormente, las espigas de Ca^{2+} también van a ser capaces de regular en la transmisión sináptica y, por tanto, participan activamente en plasticidad sináptica (Fdez de Sevilla y cols, 2007).

El aumento de calcio citosólico asociado a las espigas de Ca^{2+} puede inducir potenciación a largo plazo (LTP) (Remy y Spruston, 2007). La asociación de un potencial postsináptico excitador (EPSP) junto con la espiga de Ca^{2+} representan el patrón de actividad idóneo para inducir LTP siguiendo un protocolo parecido al de los protocolos de spike-timing dependent plasticity (STDP) (Núñez y cols, 2012). En este sentido, las espigas de Ca^{2+} dotan a las dendritas de las neuronas piramidales de capa V de propiedades eléctricas activas que van a interaccionar con las corrientes sinápticas en la regulación la transmisión sináptica (Fdez de Sevilla y cols, 2007).

2.2 Receptores de Glutamato

El glutamato es el neurotransmisor (NT) que predomina en el SNC de los mamíferos. Las acciones fisiológicas del glutamato están mediadas a través de la activación de dos familias de receptores: receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos. Los receptores inonotrópicos (iGluRs) están involucrados en la neurotransmisión rápida en el cerebro y se clasifican en tre tipos en función del agonista que los activa: receptores NMDAR (NMDARs) (ácido N-metil-D-aspartico), receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores kainato. Los receptores iGlu forman

un canal catiónico que permite el paso selectivo de iones sodio (Na^+), potasio (K^+) o calcio (Ca^{2+}), produciendo una despolarización de la neurona (Dingledine, 1999). Por su parte, los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) no forman canales iónicos, sino que se acoplan a proteínas G y regulan la actividad de enzimas de membrana y canales iónicos. De esta forma los receptores mGlu median la actividad sináptica excitadora lenta, pero prolongada, en el SNC (Nakanishi, 1992; Pin y Duvoisin, 1995; Conn y Pin, 1997). La familia de los mGluRs está constituida por ocho subtipos (mGluR1-8) y varias isoformas, que se clasifican en tres grandes grupos atendiendo a la homología de su secuencia de aminoácidos, a los mecanismos de transducción de señales y a sus propiedades farmacológicas (Fig. 8) (Nakanishi, 1992; Pin y Duvoisin, 1995; Conn y Pin, 1997). El grupo I, constituido por mGluR1 y R5, estimula la hidrólisis de inosítoles fosfato y la liberación de Ca^{2+} intracelular. El grupo II, constituido por mGluR2 y R3, está acoplado de forma negativa a la formación de AMPc. El grupo III, inhibe igualmente la formación de AMPc. Los receptores mGluR de un mismo grupo comparten una homología de secuencia de aminoácidos alrededor del 60-70%, mientras que se reduce hasta un 40-45% cuando se comparan entre miembros de diferentes grupos (Pin y Duvoisin, 1995; Conn y Pin, 1997).

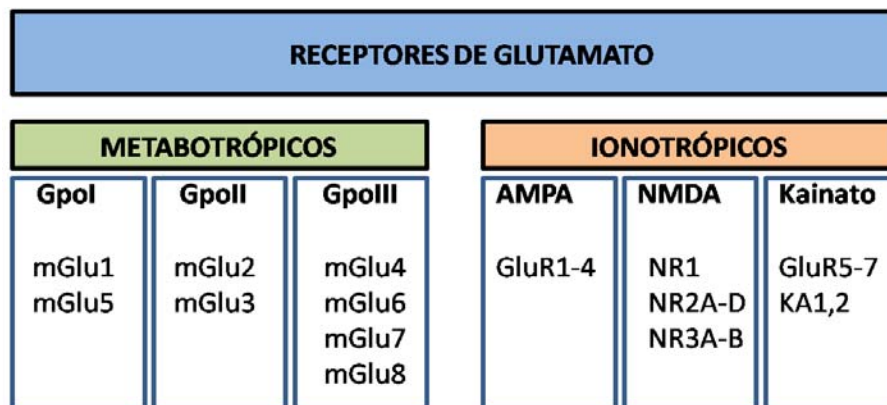


Figura 8. Clasificación de los receptores de glutamato. Los receptores metabotrópicos de glutamato son ocho (mGlu1-8) y están clasificados dentro de tres grupos (Grupos I-III). En los receptores ionotrópicos encontramos los receptores AMPA Kainato y NMDA, caracterizados de acuerdo al agonista utilizado en su diferenciación. Los receptores NMDA son complejos tetraméricos formados por las combinaciones de las subunidades NR1, NR2 y/o NR3.

Los receptores mGlu del grupo I (mGluR1 y R5) se localizan mayoritariamente a nivel postsináptico en cuerpos celulares, troncos dendríticos y espinas dendríticas (Luján, y

cols, 1996; López-Bendito y cols, 2001). Su rasgo más característico es que se localizan fuera de la densidad postsináptica de las sinapsis glutamatérgicas (Luján y cols, 1996), a diferencia de la distribución sináptica de los receptores ionotrópicos (Nusser y cols, 1998). Concretamente, se concentran en los bordes de las sinapsis glutamatérgicas, la denominación localización perisináptica, así como en la membrana extrasináptica de espinas dendrítica. Los mGluRs del grupo II se localizan tanto post como presinápticamente, dependiendo de la región nerviosa donde se expresen. En su localización postsináptica parece que no suelen asociarse directamente con sinápsis glutamatérgicas, y en su localización presináptica se localizan en la membrana plasmática de la terminación nerviosa, pero no se encuentran donde se produce la liberación del neurotransmisor (Tamaru y cols, 2001; Shigemoto y cols, 1997). Finalmente, además de su localización neuronal, se ha demostrado presencia de mGluR3 en células gliales (Tamaru y cols, 2001). Los mGluRs del grupo III se localizan fundamentalmente a nivel presináptico (Shigemoto y cols, 1997)

Dentro de los tres tipos de receptores ionotrópicos de glutamato, los receptores NMDA (NMDAR) participan en la excitabilidad general y en los mecanismos de señalización intracelular gracias a su permeabilidad al sodio, potasio y calcio. Este último ión puede modular la actividad de segundos mensajeros y enzimas intracelulares. Para activarse los NMDARs necesitan dos moléculas de L-glutamato y dos moléculas de glicina, aunque también el aspartato puede actuar como agonista y la D-serina como coagonista. Algunos de los procesos donde está involucrada la activación de los NMDAR son: la transmisión excitatoria, la **plasticidad sináptica** (LTP y LTD), el desarrollo y maduración sináptica (Asztely y Gustfon, 1995).

2.3 Receptores NMDA

Los NMDARs son complejos tetraméricos, con un canal iónico permeable al Na^+ , K^+ y al Ca^{2+} . Están ensamblados por la combinación de las subunidades de las familias NR1 (NR1a-4b), NR2(A-D) y NR3 (A y B). La expresión de dos subunidades NR1 es esencial para garantizarla funcionalidad de este receptor. Las subunidades NR2 (A-D) determinan la variación de sus propiedades biofísicas: activación, desactivación y desensibilización, que oscilan entre el orden de milisegundos hasta segundos y tienen un efecto directo en la duración de las corrientes postsinápticas excitatorias mediadas por éstos receptores. La familia NR3 tiene un efecto modulador de tipo inhibitorio. Una gran variedad de compuestos y moduladores endógenos como

Mg²⁺, Zn²⁺, pH y poliaminas regulan la actividad del canal según la subunidad NR2 presente (Cull-Candy y cols, 2001).

La principal repercusión de la variabilidad biofísica del receptor NMDA inferida por las subunidades NR2, es sobre la cinética de desactivación del canal, que oscila entre 54 ms para el subtipo NR2 hasta 1700 ms para NR2D (Vicini y cols, 1998) implicando una diferencia en la duración de las corrientes postsinápticas que pueden alcanzar el orden de segundos (Lester y cols, 1990). Por lo que existe mucha variabilidad entre los receptores NMDA, que da características a las corrientes generadas a través de éstos receptores.

Existen tres parámetros fundamentales que influyen en la funcionalidad del receptor NMDA:

1º. La composición del receptor que determina el nivel de actividad y cinética del canal.

2º. La localización sub-celular, que puede ser sináptica o extrasináptica.

3ª. La cascada de señalización a las que están ligadas cada subunidad del receptor, ya que está presente como un complejo macromolecular de señalización.

2.4 Proteínas postsinápticas asociadas al NMDAR

La apertura de los receptores NMDA inicia cascadas de señalización citoplasmáticas, ocasionando cambios a largo plazo en las neuronas mediante mecanismos transducidos por estructuras sub-celulares acopladas al receptor. El complejo lo conforman proteínas citoesqueléticas, de ensamble y enzimas de señalización que interactúan con el NMDAR física y funcionalmente mediante unión directa con el dominio C-terminal del receptor ó indirectamente mediante otras proteínas ligadas a él (Sheng y Pak, 2000). Las proteínas que más predominan en las membranas postsinápticas son las proteínas de densidad postsináptica de 95 KDa (PSD-95) Y SAP-102. Ambas contienen dominios PDZ, SH3 y GK que son estructuras encargadas de la interacción entre proteínas. Sus múltiples dominios permiten unirse simultáneamente al NMDAR y a otras enzimas como por ejemplo el óxido nítrico sintasa (NOS) dependiente de calcio (Sheng y Hyuong, 2000).

2.5 NMDAR y plasticidad sináptica

Se llama plasticidad sináptica a los mecanismos que modifican la eficacia de la sinapsis. Se manifiesta de dos maneras:

- alteración de la cantidad de NT liberado desde la presinapsis.
- cambios en el número, composición y/o funcionamiento de los receptores postsinápticos que responden al NT.

La plasticidad sináptica se caracteriza porque permanece aún después de haberse terminado la señal sináptica y se clasifican de acuerdo a su tipo (si aumenta o decrece la eficacia sináptica) y su duración. Algunos de ellos son: facilitación (milisegundos), depresión (segundos), potenciación post-tetánica (minutos), potenciación (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) (horas o días). La inducción de cada uno depende del tipo de estimulación sináptica y de su frecuencia (Nicholls y cols, 2001). Cada subtipo de receptor NMDA contribuye de diferente manera en la inducción de los procesos de plasticidad en sinapsis excitadoras, debido a diferentes propiedades del receptor, como el umbral de activación, el tiempo de desactivación y la vía de señalización activada.

3 Plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje

Aprender y recordar junto a las otras capacidades intelectuales son las habilidades más apreciadas por la humanidad, tal vez porque son la que nos distinguen en el reino animal, las que nos han dado el inmenso éxito evolutivo. El hombre siempre ha sentido un gran interés por conocer qué parte de nosotros y por qué medios se logra el aprendizaje y la memoria.

A lo largo de nuestras vidas incorporamos una gran cantidad de información acerca del mundo que nos rodea y además se mantiene una continuidad de nuestra personalidad. El aprendizaje es la adquisición de información acerca de un evento ocurrido y la memoria es la tenencia ya en el Sistema Nervioso de datos sobre determinados estímulos, que permiten interactuar con el medio de un modo más eficaz. El aprendizaje y la memoria permiten a los animales interactuar con más éxito con su entorno variable, impredecible y no pocas veces, adverso.

En **1973**, se encontraron las primeras evidencias experimentales que apoyaban las suposiciones de Cajal y de Hebb: las sinapsis tienen la capacidad de modificarse como consecuencia de su actividad (Bliss y Lomo, 1973). A esta propiedad sináptica

se la denominó potenciación (LTP: de las siglas en inglés long-term-potential) o depresión (LTD: de las siglas en inglés long-term-depression) a largo plazo, aunque también se ha demostrado la existencia de modulación a corto plazo (STP y STD: short-term-potential/depression) (Citri y Malenka, 2008)

La LTP, desde su descubrimiento ha sido propuesta como un modelo celular de los procesos que subyacen en el aprendizaje y la memoria (Bliss y Lomo, 1973). Dos analogías fundamentales sustentan la sugerencia de que la LTP pueda considerarse un buen modelo de aprendizaje y memoria: el hecho de que la potenciación a largo plazo es un cambio de conectividad duradero que depende de la actividad y que fue descrito en el hipocampo, una estructura relacionada con la memoria, y que además de representar un cambio duradero compatible con la formación de memorias, la LTP presenta una serie de propiedades que explican su participación en el aprendizaje asociativo y en el almacenamiento de información (Malenka, 2003):

- Puede generarse rápidamente, se fortalece y se prolonga con estimulación repetida.
- **Cooperatividad:** cuando se emplea una estimulación a frecuencia elevada para inducir LTP, un número de fibras presinápticas deben activarse simultáneamente para contribuir a su inducción.
- **Especificidad:** cuando la LTP se genera en un grupo de sinapsis de una célula postsináptica, las sinapsis adyacentes que no se activan durante el protocolo de inducción no mostrarán LTP.
- **Asociatividad:** la LTP se puede inducir en sinapsis con estimulación a baja intensidad, es decir, estimulación subumbral que coincida con una estimulación de mayor intensidad en otra sinapsis de la misma célula.

3.1 Inducción y expresión de la LTP

El glutamato liberado desde la terminal presináptica despolariza la membrana postsináptica por la activación de los receptores AMPA (AMPA). Esta despolarización desbloquea al NMDAR del Mg^{2+} extracelular y genera un flujo de Ca^{2+} al interior de la célula y la consecuente activación de diferentes cascadas de señalización intracelulares (Nichols y cols, 2001).

Está bien fundamentado que es necesario un umbral de intensidad de estimulación para obtener LTP. Bajo este "umbral de cooperatividad", un tren de alta frecuencia

resulta en una potenciación a corto plazo (STP) que se mantienen durante pocos minutos. La relación entre el tren de alta frecuencia y la despolarización postsináptica es el factor determinante para la inducción de la LTP asociativa (McNaughton y cols, 1978). La razón que explica la existencia de este umbral es que la inducción de la LTP está bajo el control del NMDAR. Una característica crucial e inusual de los NMDAR es que a potencial de reposo se mantiene silente, y no conduce a menos que la membrana sea despolarizada (Mayer y cols, 1984). Cuando el glutamato se une al receptor el poro del receptor se abre pero la conducción del canal se encuentra bloqueada por el ión Mg^{2+} extracelular (Watkins y Evans, 1981). El bloqueo de Mg^{2+} es dependiente de voltaje, dado que cuando la membrana celular es despolarizada el Mg^{2+} es retirado, desbloqueando la boca del canal, permitiendo la conducción de Na^{2+} , K^{+} y Ca^{2+} (Mayer y cols, 1984). La inducción de la LTP depende de la activación de los NMDAR (Collingridge y cols, 1984). La dependencia de voltaje del NMDAR proporciona la base celular para la inducción de la LTP: una sinapsis podría incrementar su eficacia sináptica, si y sólo si, la región de la dendrita en la cual se encuentra está fuertemente despolarizada (Wigstrom y Gustafsson, 1985). Así el NMDAR actúa como un detector de coincidencia, respondiendo simultáneamente a la activación de entradas sinápticas y una adecuada despolarización de las dendritas. La activación de los NMDAR induce un rápido aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} en la célula postsináptica, condición fundamental para la inducción de la LTP (Malenka y cols, 1988). Además Malenka y su equipo demostraron que el aumento de Ca^{2+} intracelular es necesario y suficiente para inducir una potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica.

En la neurona postsináptica, el Ca^{2+} induce LTP activando cascadas de señalización intracelular que incluyen proteínas quinasas activadas por Ca^{2+} (Abraham y cols, 2002; Purves, 2012). Numerosos trabajos identifican a la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) como un componente necesario para la maquinaria molecular de la LTP. La CaMKII se somete a autofosforilación después de la activación de la LTP y se ha comprobado que la inducción de LTP se revierte tanto en ratones knock-out para una subunidad de la CaMKII como en ratones en los que se sustituye la CaMKII por un análogo que carezca de su lugar de autofosforilación. La diana de la cascada de señalización intracelular de estas quinasas no está claramente definida pero aparentemente incluye receptores AMPA y otras proteínas de señalización intracelular (Citri y Malenka, 2008).

Otras quinasas, como la proteína quinasa C o A, también han sido identificadas como participantes en la activación de la LTP, pero su papel no está tan ampliamente demostrado como el de la CaMKII. La activación de la PKA se ha propuesto como impulsora de la actividad de la CaMKII de una manera indirecta, disminuyendo la actividad competitiva de proteínas fosfatasas. La vía extracelular de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) también se ha propuesto como importante para la LTP, y para algunas formas de aprendizaje y memoria. Finalmente, la proteína quinasa C, y en particular su isoenzima atípica, PKM ζ , se expresa rápidamente desde la inducción de LTP y está implicada en el mantenimiento de la última fase de LTP (Citri y Malenka, 2008).

El incremento de la sensibilidad de la célula postsináptica al glutamato fortalece la transmisión sináptica durante la LTP. La sinapsis excitadoras pueden regular sus receptores postsinápticos de glutamato de forma dinámica y pueden incluso añadir nuevos receptores AMPA a sinapsis silentes que previamente no los expresaban (Takahashi y cols, 2003). El mantenimiento de la LTP se debe, aparentemente, a la inserción de receptores AMPA en la membrana postsináptica, a diferencia de la inducción de la LTP que fundamentalmente precisa de la activación de receptores NMDA. Los nuevos receptores AMPA sinápticos se estabilizan a través de la interacción con una familia de proteínas transmembrana reguladoras de los receptores AMPA (TARPs) con guanilato quinasas asociadas a membrana (MAGUKs), principalmente la PSD-95 (Takamashi y cols, 2003; Citri y Malenka, 2008). El aumento de la densidad de receptores AMPA en las espinas dendríticas favorece la respuesta de la célula postsináptica al glutamato liberado, fortaleciendo la transmisión sináptica. El principal mecanismo de expresión de la LTP, implica el incremento en el número de AMPAR en la membrana postsináptica, que depende del tráfico intracelular de estos receptores de glutamato, proceso que es regulado por la activación de la CaMKII (Malenka y Nicoll, 1999; Malinow y Malenka, 2002).

De forma paralela, la LTP también genera cambios estructurales. El tamaño de la densidad postsináptica aumenta, así como el número de espinas dendríticas. Estos incrementos suponen una mayor amplitud de la zona postsináptica activa permanecen agrandadas las sinapsis que se potencian (Matsuzaki y cols, 2004). El mantenimiento de estos cambios durante varias horas depende de cambios en la expresión génica y de la síntesis de nuevas proteínas. Esta fase final parece desencadenarse por la PKA que activa factores de transcripción tales como CREB para proporcionar a las sinapsis la base proteica necesaria para mantener la eficacia sináptica (Matsuzaki y cols, 2004; Citri y Malenka, 2008). También el número de contactos sinápticos aumentan durante

la LTP. Algunas de las nuevas proteínas que se sintetizan durante las últimas fases de la LTP participan en construir nuevos contactos sinápticos que sirven para mantener la LTP y hacer que sea esencialmente permanente (Purves, 2012).

Se piensa que la regulación de los procesos de LTP y LTD por los receptores NMDA es bidireccional, tomando estos mecanismos como procesos independientes. Esta idea surgió de la observación de que estimulaciones de alta frecuencia (~100 Hz) causan una fuerte activación del NMDAR, permitiendo un gran flujo de Ca^{2+} al interior de la célula desencadenando la LTP. Por el contrario las estimulaciones a baja frecuencia (~5 Hz) producen una moderada activación de éstos canales induciendo una depresión a largo plazo (LTD). La respuesta bidireccional radica en que las estimulaciones de alta y baja frecuencia activan diferentes sub-poblaciones de receptores NMDA. Los receptores NMDA que contienen las subunidades NR2A y NR2B requieren una despolarización más pronunciada para lograr desbloquear el poro del canal, mientras que los NMDAR compuestos por NR2C y NR2D poseen un umbral más bajo (Monyer y cols, 1992). Las diferencias en duración y conductancias de aperturas de ambas sub-poblaciones contribuyen de diferente manera en la regulación del flujo de Ca^{2+} y por lo tanto en la inducción de LTP y/o LTD (Artola y Singer, 1993; Hansel y cols, 1997; Citri y Malenka, 2008).

3.2 Spike Timing Dependent Plasticity (STDP)

Como hemos mencionado en el apartado anterior, tradicionalmente la LTP se induce por estímulos a alta frecuencia de repetición (EAFR) y la LTD por estímulos a baja frecuencia, pero existe otra forma de inducir plasticidad a largo plazo por apareamiento de actividad pre y postsináptica (Markram y cols, 1997). El orden temporal en la coincidencia del potencial de acción postsináptico y la llegada del EPSP presináptico da lugar a plasticidad dependiente de las “ventanas críticas” para el tiempo de disparo de los dos componentes. De esta forma se ha demostrado que la estimulación a baja frecuencia acoplada a una despolarización postsináptica (“pairing protocol”), puede inducir LTP en el hipocampo y en diferentes áreas corticales (Kelso y cols, 1986; Sastry y cols, 1986; Malenka y Nicoll, 1999; Lisman y Spruston, 2005).

La retropropagación de potenciales de acción por el árbol dendrítico proporciona una señal despolarizante precisa capaz de proporcionar un estado activo para las modificaciones sinápticas asociativas (Stuart y cols, 1997). El orden temporal de la actividad pre y postsináptica es crucial para la inducción de modificaciones en las

conexiones sinápticas (Markram y cols, 1997). Específicamente, la ocurrencia repetitiva de una espiga presináptica seguida de cerca de una espiga postsináptica induce LTP, por el contrario, si la espiga postsináptica precede a la presináptica se induce LTD (Markram y cols, 1997; Feldman, 2000; Nevian y Sakmann, 2006). Esta forma de inducción de la plasticidad sináptica depende del orden y tiempo del potencial de acción Pre y Post-sináptico y es lo que ha pasado a llamarse Spike-Timing-Dependent plasticity (STDP). Las diferencias en el patrón temporal de las señales postsinápticas de Ca^{2+} es lo que determina las propiedades de la STDP. Específicamente, si un potencial de acción ocurre después de la actividad presináptica, el aumento de Ca^{2+} postsináptico mediado por receptores NMDA generará LTP. Por el contrario, si el potencial de acción postsináptico tiene lugar antes que la activación presináptica, la despolarización asociada a este potencial de acción desaparecerá al tiempo en que ocurra el EPSP. Esta secuencia de eventos reducirá la entrada de Ca^{2+} a través de receptores NMDA, provocando LTD (Markrman y cols, 1997; Dan y Poo, 2006).

La característica más notable del STDP es su dependencia del orden temporal de las espigas pre y postsinápticas. La inducción de STDP requiere la activación de los NMDAR y de potenciales retropropagados en las dendritas (Markram y cols, 1997; Bi y Poo, 1998). La explicación que se ha dado para la dependencia de la STDP es la coincidencia entre la unión del glutamato a los NMDAR y la espiga retropropagada en la dendrita que determina el nivel de Ca^{2+} requerido para inducir LTP o LTD. La LTP se induce cuando el orden de las espigas es pre-post de modo que el glutamato activa el NMDAR y la despolarización remueve el Mg^{2+} desde el NMDAR, provocando un gran aumento de Ca^{2+} intracelular, mientras que la generación de las espigas en el orden post-pre induce LTD, posiblemente por una menor entrada de Ca^{2+} intracelular por apertura de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes y/o una limitada activación de los NMDAR o a la activación de receptores metabotrópicos de glutamato (Nevian y Sakmann, 2006; Dan y Poo, 2006).

El influjo de Ca^{2+} a través de los NMDAR activa distintas cascadas de señalización intracelular que conducen a LTP o LTD (Malinow y Malenka, 2002). En estudios utilizando registros de señal de calcio con sondas fluorescentes, demostraron que el influjo de Ca^{2+} a través de los NMDAR y canales dependientes de voltaje, muestra un gran aumento de Ca^{2+} cuando el orden de las espigas es pre-post y se da un pequeño aumento de Ca^{2+} intracelular cuando el orden de las espigas es post-pre (Yuste y Denk, 1995; Koester y Sakmann, 1998; Schiller y cols, 1998).

La ventana temporal de la LTP inducida por STDP es de ~20 ms, siendo este tiempo más corto que la constante de disociación entre el glutamato y el NMDAR (Mayer y cols, 1984). Una de las explicaciones posibles para esta estrecha ventana de tiempo es el bloqueo de los NMDAR por el Mg^{2+} . Asegurándose así unas condiciones muy selectivas para que se de la LTP. Es necesario que en esa estrecha ventana estén activos suficientes receptores NMDA para que se dé un gran flujo de Ca^{2+} a través de éstos receptores y se activen las cascadas de señales intracelulares necesarias. Se necesitan 20 ms entre que el glutamato es liberado desde la presinapsis hasta que la célula postsináptica dispara. Así cuando gracias al APs postsináptico se libere el Mg^{2+} y queden accesibles los NMDAR se encuentre el glutamato en la hendidura sináptica y se puedan activar los NMDAR, entrando el Ca^{2+} necesario para inducir la LTP. Si el tiempo es mayor no quedará glutamato suficiente y si es menor no habrá suficiente NMDAR activo con lo que el flujo de Ca^{2+} será menor y se inducirá LTD. Debido a que la constante de tiempo de unión del glutamato al NMDAR es mucho más larga que 20 ms, la ventana temporal de coincidencia para inducir LTP puede depender de mecanismos celulares adicionales: la activación de canales de Ca^{2+} y de reservorios intracelulares de Ca^{2+} o la activación dependiente de Ca^{2+} de enzimas intracelulares (CaMKII, Calmodulina, PKA) y la modulación de canales de K^+ dendríticos, que permiten la invasión sináptica de espigas retropropagadas (Hoffman y cols, 1997; Watanabe y cols, 2002; Dan y Poo, 2006).

3.3 Integración sináptica y STDP

Cómo se ha descrito en el apartado anterior, la inducción de la STDP es dependiente de la asociación temporal entre el potencial de acción presináptico y la retropropagación del potencial de acción por el árbol dendrítico. Para iniciar un potencial de acción es necesario que los EPSPs se propaguen desde su zona de generación a la zona de iniciación del AP (cono axónico) (Stuart y Sakmann, 1994; Sakmann, 1997). La propagación de potenciales sinápticos depende de las propiedades pasivas de la neurona, la estructura del árbol dendrítico y de los canales iónicos presentes en las dendritas. La capacidad de un potencial sináptico de despolarizar la membrana celular hasta alcanzar el umbral de generación del potencial de acción en el cono axónico depende del tamaño del EPSP y de cuál es su atenuación mientras se propaga por el árbol dendrítico. Tres propiedades eléctricas pasivas de las dendritas contribuyen a la estructura electrónica del árbol dendrítico: la resistencia específica de la membrana (R_m), la capacitancia de la

membrana (C_m) y la resistencia intracelular (R_i). Además, la atenuación depende también de la frecuencia de la señal, siendo mayor la atenuación para señales más rápidas (Rall, 1967; Spruston y cols, 1994).

Además de la estructura electrónica, las dendritas de las neuronas piramidales presentan una gran variedad de canales iónicos dependientes de voltaje o Ca^{2+} . Las conductancias iónicas de Na^{2+} y Ca^{2+} activadas por voltaje favorecen la propagación de los EPSPs y de los potenciales de acción retropropagados (PAR), ya que despolarizan la membrana. Por el contrario, las conductancias de K^+ activadas por voltaje o Ca^{2+} atenúan la propagación de esos potenciales, hiperpolarizando las dendritas y aumentando la conductancia de la membrana (Stuart y Sakmann, 1994; Hoffman y cols, 1997; Johnston y cols, 2000). De este modo, las propiedades y la distribución de los canales iónicos distribuidos a lo largo de la neurona, determinan las características funcionales de los distintos territorios y su capacidad para regular el flujo de señales, así como la iniciación y propagación de la señal eléctrica que da lugar a la generación de un potencial de acción propagado por el axón y retropropagado por la dendrita (Hoffman y cols, 1997; Johnston y cols, 2000).

3.4 Astroцитos y plasticidad sináptica

Las células gliales, constituidas por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP) y por la astroglia, oligodendroglía y microglía en el sistema nervioso central (SNC), representan otro tipo celular fundamental en el SNC, a parte de las neuronas. La función que se le atribuyó a la glia cuando fue descrita por primera vez fue la de ser el aglutinante y el soporte del SN (Virchow, 1846). Como ya apuntó Cajal, la glía no sólo tiene esa función de aglutinante, si no que desempeña muchas funciones en el SN estando implicado en el soporte trófico y metabólico neuronal, en la diferenciación, en el crecimiento neurítico, en la homeostasis cerebral, etc (Ramón y Cajal, 1911, Takeshima y cols, 1994; Kuwada, 1986, Smith y cols, 1990). Se adjudicaron muchas funciones a la glía, pero ninguna relativa al procesamiento de la información. Sin embargo, en estos últimos años se ha podido comprobar que existe una comunicación bidireccional entre la neurona y el astrocito, y que los astroцитos participan de forma activa como procesador de la información en el SN (Araque y cols, 2001).

En un principio se descartó la idea de la participación activa de los astrocitos debido a que carecen de la propiedad principal de las neuronas que es la excitabilidad eléctrica. Los astrocitos tienen canales activados por voltaje pero su número es insuficiente y no generan respuestas del tipo neuronal, si no que se producen pequeñas variaciones en su potencial de membrana (Barres, 1991; Sontheimer, 1994). La excitabilidad de los astrocitos se basa en variaciones de calcio intracelular que puede deberse a la actividad neuronal lo que demuestra la comunicación entre neurona-astrocito (Charles y cols, 1991). Éstas señales de calcio pueden propagarse a otros astrocitos adyacentes debido a la comunicación que existe en la red astrocitaria dando lugar a lo que se llamó onda de calcio (Araque, 1998).

La señal de calcio en los astrocitos puede modular la actividad neuronal, de modo que los estímulos que aumentan el calcio intracelular en los astrocitos provocan en las neuronas adyacentes aumentos de calcio dependientes de la activación de receptores neuronales de glutamato. Estas respuestas neuronales son debidas a que los astrocitos liberan glutamato, siendo esta liberación dependiente del aumento de calcio en los astrocitos (Araque y cols, 1998; Pasti y cols, 1997; Araque y cols, 2000). La comunicación es bidireccional, ya que los astrocitos responden a neurotransmisores liberados sinápticamente, debido a que tienen una gran variedad de receptores para distintos neurotransmisores. Tienen receptores ionotrópicos que permiten un flujo selectivo de iones y receptores metabotrópicos que están acoplados a distintas rutas de segundos mensajeros intracelulares (Porter y McCarthy, 1997; Murphy y Pearce, 1987). Los astrocitos se sabe que tienen receptores para glutamato, adenosina, norepinefrina, GABA, ATP, histamina, Ach, y la activación de éstos hace que aumente el calcio intracelular de los astrocitos (Pasti y cols, 1997; Porter y McCarthy, 1997; Araque, 1998; Kang y cols, 1998). La comunicación neurona-astrocito ha introducido un nuevo concepto, en la comunicación y procesamiento de la información llamado **sinapsis tripartita** (Fig. 9) (Araque y cols, 1998). Los astrocitos responden con aumentos de calcio a diferentes neurotransmisores liberados por las terminales sinápticas, con lo que la actividad sináptica provoca la excitabilidad en los astrocitos y activa la comunicación entre neurona-astrocito (Araque, 2003).

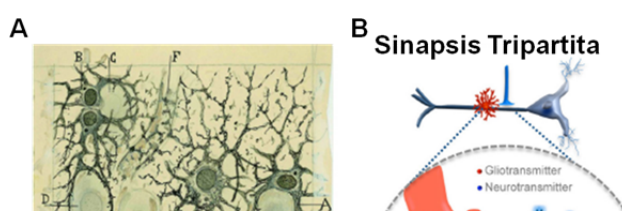


Figura 9. Sinapsis Tripartita: relación entre neuronas y astrocitos en la sinapsis. A: Dibujo de Cajal mostrando la "neuroglia" en la capa piramidal del Estratum radiatum de hipocampo. B: Esquema de una sinapsis sobre una dendrita apical de una neurona piramidal y un astrocito (en rojo) cerca de ella. (Araque, 2014).

Los astrocitos también participan en la **regulación de la transmisión sináptica**. Los astrocitos modulan la transmisión

sináptica por liberación de gliotransmisores que activan a receptores de la pre o la postsinapsis. El glutamato liberado por los astrocitos se ha mostrado que refuerza algunas sinapsis a través de diferentes mecanismos, por ejemplo; la activación de mGluRs presinápticos por glutamato liberado de los astrocitos adyacentes, incrementa la frecuencia de corrientes postsinápticas tanto espontáneas como evocadas (EPSCs) potenciando así la probabilidad de liberación de neurotransmisor en las sinapsis de CA3-CA1 en el hipocampo (Perea y Araque, 2007). También se ha observado que la liberación de glutamato por el astrocito modula la transmisión sináptica inhibitoria incrementándola entre interneuronas y células piramidales de CA1 (Kang y cols, 1998). Los astrocitos responden a diferentes neurotransmisores y modifican la transmisión sináptica, así los astrocitos de la región del estratum radiatum de hipocampo aumentan su calcio intracelular en respuesta a glutamato liberado por la neurona presináptica mediante receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) (Porter y McCarthy, 1996). Además los astrocitos de la región del estratum oriens en el hipocampo aumentan su calcio en respuesta a acetilcolina por medio de los mAChRs (Araque y cols, 2002). Por lo tanto los astrocitos pueden diferenciar distintas vías de señalización y tener respuestas selectivas para la participación del procesamiento de la información.

El sistema endocannabinoide es un importante sistema de señalización intercelular, que participa en una gran variedad de procesos fisiológicos. Los endocannabinoides (eCBs) mediante la activación del receptor CB1R juegan un papel importante como neuromoduladores en el cerebro (Chevalleyre y cols, 2006). Los eCBs median la inhibición retrógrada de la liberación de neurotransmisores, controlan la excitabilidad neuronal, y regulan procesos de plasticidad sináptica a corto y a largo plazo (Chevalleyre y cols, 2006). La señalización generalmente aceptada de los eCBs es la de inhibir la liberación de neurotransmisores desde la terminal presináptica (Chevalleyre, 2006). Los CB1Rs no son exclusivos de las neuronas, ya que los astrocitos también expresan CB1Rs funcionales, que se activan por los eCBs liberados desde las neuronas piramidales, provocando aumentos de calcio en los astrocitos y la liberación de glutamato, lo cual modula la excitabilidad neuronal a través de la activación de NMDARs en las neuronas (Navarrete y Araque, 2008). Los eCBs liberados por las neuronas potencian las corrientes sinápticas excitadoras mediante la activación de receptores CB1R presentes en los astrocitos y la liberación de glutamato desde los astrocitos que actúa activando los receptores para glutamato mGluR I presinápticos (Navarrete y Araque, 2010).

Los astrocitos además pueden estar extensamente conectados por medio de *gap-junctions* formando lo que se denomina sincitio. Esto permite formar redes funcionales en la que los astrocitos pueden comunicarse y la onda de calcio intracelular podría propagarse a largas distancias desde el punto de origen, pudiendo regular sinapsis muy alejadas. A este fenómeno se le conoce como **regulación sináptica lateral** astrocitaria (Fellin y Carmignoto, 2004; Perea y Araque, 2005).

II. OBJETIVOS

La Acetilcolina modula la excitabilidad postsináptica y las respuestas sinápticas en las neuronas piramidales de capa V de la corteza de barriles, activando receptores muscarínicos que inducen el aumento de la relación excitación-inhibición facilitando la aparición de espigas de Ca^{2+} (Fdez de Sevilla y cols, 2012). Otros trabajos demuestran en células de Purkinje del cerebelo (Llano y cols, 1991) como en las células piramidales del hipocampo (Piter y Alger, 1992) que la despolarización de las neuronas postsinápticas induce una supresión transitoria de las corrientes sinápticas inhibitorias (IPSC), fenómeno al que se le ha llamado DSI (Depolarization-induced Suppression of Inhibition). Por lo que existen distintos mecanismos en los cuales el balance entre excitación/inhibición pueden alterarse.

Recientes hallazgos sugieren la importancia de las células gliales en el desarrollo y maduración sináptica así como en la modulación de la plasticidad. Defectos en la función glial afectarán a los procesos de maduración y modulación de la transmisión sináptica, limitando la capacidad para expresar los fenómenos de aprendizaje y memoria (Araque y cols, 1999; Beattie y cols, 2002; Volterra y Bezzi, 2002).

Con éstas evidencias nosotros nos planteamos la posibilidad de que las espigas de Ca^{2+} generadas, podrían ser capaces de inducir plasticidad sináptica al aumentar el calcio en la espina dendrítica (Shiller y cols, 2000) y que mecanismos podrían estar subyacentes a estas espigas de Ca^{2+} . Para ello perseguimos los siguientes objetivos:

1- Si estas espigas de calcio son capaces de inducir LTP, estudiar los mecanismos de inducción de plasticidad sináptica mediados por estas espigas de Ca^{2+} en las sinapsis glutamatérgicas de las neuronas piramidales de capa V. Determinaremos si la espiga de calcio induce plasticidad Hebbiana a largo plazo (LTP o LTD) de forma similar a la inducida con protocolos de *Spike Timing Dependent Plasticity* (STDP). Analizaremos los mecanismos de expresión (pre y/o postsinapticos), así como el umbral de esta plasticidad.

2- Analizaremos la dependencia de esta forma de plasticidad sináptica de posibles fuentes de aumento de Ca^{2+} (receptores NMDA, canales de Ca^{2+} activados por voltaje, canales de Ca^{2+} de reservorios intracelulares en el retículo, etc) y estudiaremos el tipo de proteína Kinasa o fosfatasa implicada.

3- Analizaremos la posibilidad de generar estas espigas de Ca^{2+} de forma más fisiológica a la de bloquear la transmisión sináptica inhibitoria.

4- Por último, debido a la importancia en los últimos años de la glia en el procesamiento de la información y en la plasticidad sináptica (Araque y cols, 2001), estudiaremos si los astrocitos participan de algún modo en la plasticidad generada por las espigas de Ca^{2+} .

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas postnatales Sprague Dawley de ambos sexos, de 11 a 25 días, criadas en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. También fueron utilizados ratones C57BL/6 y ratones IP3R2-KO del animalario del *Biomedical building* de la universidad de Minesota. Todos los procedimientos experimentales para la manipulación y el sacrificio de los animales se realizaron de acuerdo con la normativa de la Unión Europea (European Communities Council Directive, 86/609/EEC) y de acuerdo con los procedimientos RD 1201/2005, minimizando el sufrimiento y el número de animales de experimentación en lo posible.

2. Obtención y preparación de rodajas de rata.

Los animales fueron decapitados, y el encéfalo extraído rápidamente y sumergido en líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) a $\sim 4^{\circ}\text{C}$. Inmediatamente después de la extracción, se colocó el encéfalo en la cámara de corte y se obtuvieron cortes coronales ó talamocorticales (300-400 μm de espesor) con un vibratomo (Leica VT 1200S). Las rodajas así obtenidas, se mantenían incubadas durante aproximadamente 50 minutos en LCA burbujeado continuamente con carbógeno y posteriormente eran transferidas a una cámara de 2 ml con una perfusión de 1ml/min de flujo para el registro electrofisiológico. Tanto la obtención y mantenimiento de los cortes como el registro electrofisiológico se llevaron a cabo en una solución de líquido cefalorraquídeo artificial, burbujeada con carbógeno (95% de O_2 / 5% de CO_2). Todo el proceso de obtención de cortes se realizó en frío, 4°C , y el registro electrofisiológico a temperatura ambiente.

3. Registros electrofisiológicos.

Para realizar los registros electrofisiológicos, se identificaron las neuronas piramidales de capa V, en base a su morfología y localización utilizando dos métodos diferentes: visualmente a través de una cámara y un microscopio óptico (ORCA R2, Hamamatsu) previamente al registro electrofisiológico identificándolas por su gran tamaño y su situación en una capa clara adyacente a la capa IV donde se podía identificar sin dificultad los barriles característicos de esta capa (Fig. 1A). A mayores aumentos observábamos las neuronas piramidales de esta capa (Fig. 1B) y mediante

registro electrofisiológico, con un protocolo de pulsos de corriente de 900 ms de duración, que aplicaba pulsos desde hiperpolarizantes, hasta despolarizantes, que hacían disparar a la neurona permitiéndonos identificarlas también por su patrón de descarga (Fig. 1C). Por otro lado, utilizando técnicas histoquímicas mediante el llenado a través de la pipeta de registro con neurobiotina (1%) y posterior revelado de la rodaja con el método histoquímico del complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (Elite, PK-6100, VECTOR), revelado con diaminobencidina (DAB) (SIGMA) (Solución DE revelado: 0.022% DAB + 0.33% H₂O₂/tampón fosfato salino (PBS 0.1M) (Fig. 1D). Visualizamos los cortes revelados en el microscopio óptico (Axioskop, ZEISS) y tomamos fotografías a aumentos de 10x, 20x y 40x con la cámara (AxioCam ICc1, ZEISS).

Los registros electrofisiológicos de las neuronas piramidales de capa V de corteza somatosensorial se realizaron usando la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera. Los electrodos de registro se fabricaron a partir de capilares de borosilicato con capilar interno (OD-ID: 1.5-0.86; Sutter Instrument CO., Novato , CA), con una resistencia de 4-8 MΩ y se llenaron con una solución intracelular que contenía (en mM): NaCl 124; KCl 2.69; KH₂PO₄ 1.25; MgSO₄ 2; NaHCO₃ 26; Glucosa 10; CaCl₂ 2; CH₃COCOONa 3; C₆H₈O₆ 100; pH=7.3 – 7.4). Los registros electrofisiológicos se realizaron con amplificadores PC-ONE (Dagan, Minneapolis, MN). Las capacitancias rápida y lenta fueron neutralizadas y la resistencia en serie fue compensada (alrededor del 70%). El potencial de membrana se mantuvo a -60/-70 mV. Los experimentos en los que las células presentaron un cambio en la resistencia en serie superior al 10% fueron rechazados. Las señales fueron filtradas a 3 KHz y digitalizadas con una frecuencia de muestreo de 10 KHz a un ordenador Pentium III mediante una tarjeta de conversión analógico-digital (Digidata 1200B, Axon Instrument). Para la generación de los estímulos, la adquisición y el almacenamiento de los datos se empleó la aplicación clampex del programa PCLAMP 8 (Axon Instruments)

4. Protocolos de estimulación.

Se realizaron los experimentos con protocolos de estimulación convencional. La estimulación eléctrica de las vías axónicas se produjo por estimulación convencional mediante el uso de electrodos bipolares de nicrom (80 μm de diámetro), conectados a un estimulador (Cibertec-Stimulator CS220) a través de unidades de aislamiento (Isolation Unit MOD-100). Los electrodos de estimulación se situaron en la

vía talamocortical (desde el núcleo posterior del tálamo, PO, la cápsula interna, el estriado, hasta la capa VI a 100 μm del soma).

Para obtener la línea base se registraron corrientes sinápticas controles en VC a un potencial de membrana $V_H = 60 \text{ mV}$, con una intensidad de estimulación subumbral y una frecuencia de muestreo de 0.33 Hz. Cuando estas corrientes de entrada conseguían una amplitud constante obteníamos el registro control durante al menos 5 minutos. Después de obtener la línea base control, pasábamos al protocolo de inducción, la generación de las espigas de calcio: para ello estimulábamos en este caso en fijación de corriente (*del inglés, current clamp* (CC)) y aumentábamos la intensidad de estimulación hasta obtener una respuesta supraumbral que consistía en un EPSP seguido de una espiga de Na^+ y seguida de una despolarización lenta asociada a un aumento de calcio citosólico. Este protocolo de inducción de plasticidad similar al STDP, tenía una duración de 5 minutos generándose 60 repeticiones a una frecuencia de 0.2 Hz.

5. Imagen de calcio

Tanto las neuronas piramidales como los astrocitos fueron identificados de acuerdo a sus propiedades morfológicas y electrofisiológicas. Los niveles de calcio fueron registrados mediante microscopía de fluorescencia, utilizando el indicador de calcio fluo4-K. Éstos marcadores fueron utilizados en neuronas y en red de astrocitos aplicados intracelularmente a través del electrodo de registro. En astrocitos también se aplicó incubando la rodaja en una solución con fluo4-AM (Molecular Probes, Eugene, OR). En este caso las rodajas fueron incubadas durante 30-60 min a temperatura ambiente. Se aplicó directamente 2-5 μl del marcador a una concentración de 2 mM sobre la zona de la corteza, alcanzando una concentración final de 2-10 μM . En estas condiciones, la mayoría de las células llenadas fueron astrocitos (Araque y cols, 2002) y fueron identificados por su morfología y confirmado en algunos casos por sus propiedades electrofisiológicas. La señal de calcio se midió con un sistema de imagen de calcio utilizando una cámara Orca R2 y un sistema de excitación por luz ultravioleta generada mediante un LED de 490 nm (COLLED).

Para estimar si existían cambios en los niveles de calcio intracelular en los astrocitos se analizó la razón $(F-F_0)*100/F_0$, siendo F la fluorescencia obtenida en cada secuencia y F_0 la fluorescencia basal (F_0 =promedio de 5-10 valores de fluorescencia

anteriores al estímulo aplicado o valores correspondientes al inicio de registro). A los valores de fluorescencia se restó la señal de fondo (background) correspondiente a procesos de autofluorescencia de las células y uniones no específicas de la sonda con otros elementos. Se consideró que existía respuesta astrocitaria de calcio cuando la señal de fluorescencia, $(F-F_0)*100/F_0$ era 3 veces superior al desvío estándar de la señal basal.

La cuantificación de la señal de calcio astrocitaria se cuantificó midiendo la probabilidad de ocurrencia de un aumento de calcio, definido como aumento transitorio de calcio y la frecuencia de las oscilaciones de los aumentos de calcio. La probabilidad de aumentos de calcio fue calculado a partir del número de elevaciones de calcio agrupados en intervalos de 5 s registrados a partir de 5-15 astrocitos en el campo visual, durante intervalos de 50 s antes (basal) y después de la generación de la espiga de calcio en la neurona piramidal. Los valores medios se obtuvieron del análisis promedio de al menos 5 rodajas en cada condición.

6. Agentes farmacológicos

En la cámara de registro usábamos una solución control: **LCA control** compuesta por (en Mm): NaCl 124; KCl 2.69; KH_2PO_4 1.25; MgSO_4 2; NaHCO_3 26; Glucosa 10; CaCl_2 2; $\text{CH}_3\text{COCOONa}$ 3; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 100; pH=7.3 – 7.4). Sobre este LCA control dependiendo los experimentos realizados se aplicaron drogas usadas en el baño: **PiTX (50 μM)**: picrotoxina, bloquea los receptores Gabaérgicos tipo A. **D-APV(50 μM)**: D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid, es un antagonista selectivo de los receptores NMDA. **CNQX(20 μM)**: 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium, antagonista de los receptores AMPA y Kainato. **Nifedipina(20 μM)**: 1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid dimethyl ester, bloquea canales de calcio dependientes de voltaje tipo L. **MCPG(0.1mM)**: (RS)- α -Methyl-4-carboxyphenylglycine, antagonista no selectivo de los mGluR del grupo I y II. **MPEP(5 μM)**: (RS)- α -Methyl-4-carboxyphenylglycine, antagonista selectivo de los mGluR5. **LY367385 (50 μM)**: (S)-(+)- α -Amino-4-carboxy-2-methylbenzeneacetic acid, antagonista selectivo de los mGluR1. **Atropina (10 μM)**: Antagonista de los receptores colinérgicos muscarínicos (mAChRs). **DAU5884 (1 μM)**: Antagonista de los mAChR de tipo3. **Pirenzepina (75 nM)**: Antagonista de los mAChR de tipo1. **MMA (10 μM)**/ **MLA (50 μM)**: methyllycaconitine citrate, antagonista de los receptores nicotínicos de Ach. **U73122 (1 μM)**: 1-[6-[[[(17 β)-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-

1*H*-pyrrole-2,5-dione. Inhibidor de la fosfolipasa C. **AM251 (50 mM)**: *N*-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1*H*-pyrazole-3-carboxamide, antagonista de los receptores CB1. **Fluorocitrato de Bario (200 μM)**: reduce el metabolismo celular de los astrocitos dejándolos inactivos, (Hassel B et al, 1992; Berg-Johnsen J et al, 1993; Fonnum F et al, 1997).

Los electrodos de registro se llenaron con una **solución intracelular control**, que contenía (en mM): 135 K-gluconato, 0.5 EGTA, 10 HEPES, 10 NaCl, 1 MgCl₂, 4 Na₂-ATP, 0.4 Na₃-GTP a pH 7.3, en ocasiones bloqueamos mecanismos intracelulares añadiendo drogas en esta solución intracelular : **MK801 maleate (80 μM)**: (5*S*,10*R*)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imine maléate, antagonista irreversible de los receptores NMDA. **BAPTA (50 mM)**: 2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N,N*-tetraacetic acid, quelante selectivo de calcio. **GDPβS (1 mM)**: Bloqueante de las proteínas G. **AIP (5 μM)**: Autocamtide-2-related inhibitory peptide, inhibidor de la CAMKII. **H89 dihydrochloride (10 μM)**: inhibidor de la Proteína kinasa A (PKA). **Chelerythrine (5 μM)**: inhibidor de la Proteína kinasa C (PKC). **QX314 (5 mM)**: *N*(2,6-Dimethylphenylcarbamoylmethyl) triethylammonium bromide. inhibidor de canales de Na⁺ activados por voltaje. **Ruthenium red (400 μM)**: bloquea la liberación de Ca²⁺ desde la mitocondria y desde los canales sensibles a ryanodina del retículo endoplásmico. **Heparina (5 mg/mL de intracelular)**: Bloquea la liberación de Ca²⁺ intracelular desde el retículo endoplásmico por los receptores de IP3.

7. Análisis de datos

La recogida de datos se realizó con un ordenador PC Pentium III y para la adquisición y almacenamiento de datos se empleó la aplicación Clampex del programa pCLAMP 10.3 (Axon Instruments). El análisis estadístico y la representación gráfica de los datos se realizaron mediante el uso de los programas Excel (Microsoft Office 2007) y Sigmaplot 11.0. La adquisición y procesamiento de las imágenes de calcio de las neuronas piramidales se realizó con el programa Image Workbench 6.0. La medida de fluorescencia en los astrocitos y el tratamiento de las imágenes de calcio se realizaron con los programas MetaMorph e Image J respectivamente.

Los datos son expresados como la media ± el error estándar, indicándose en cada caso el tamaño de la muestra (n). Las diferencias estadísticas fueron establecidas usando el test t de student, asignándose un asterisco (*) a diferencias

significativas con $p < 0.05$, dos asteriscos (**) a diferencias muy significativas con $p < 0.01$ y tres asteriscos (***) a diferencias altamente significativas con $p < 0.001$.

La magnitud del cambio en la amplitud del pico de los EPSCs fueron expresadas como una proporción (%) de la línea base control (% con respecto al control) y graficado en función del tiempo. El origen del cambio en la amplitud de los EPSCs inducido por las espigas de calcio fue investigado con dos medidas: 1) el cambio en la proporción de las respuestas de pares de pulsos (PPR) definido como $R2/R1$, donde $R1$ y $R2$ son el pico de la amplitud del primer y del segundo EPSC respectivamente, y 2) las modificaciones en la varianza de los EPSCs paralelamente a los cambios en la amplitud de los EPSCs, lo cual refleja los cambios en la probabilidad de liberación. Para estimar modificaciones en la varianza de los EPSCs, primero calculamos el coeficiente de variación libre de ruido (CV_{NF}) de las respuestas sinápticas en control y 30 minutos después de la inducción de las espigas de calcio con la fórmula: $CV_{NF} = \sqrt{(\delta_{EPSC}^2 - \delta_{ruido}^2)/m}$, donde δ_{EPSC}^2 y δ_{ruido}^2 son la varianza del pico del EPSC y de la línea base, respectivamente, y m es la amplitud de pico del EPSC. La proporción del CV medido a los 30 minutos con respecto al control fue medido para cada neurona como: $CV_{despues\ de\ las\ espigas} / CV_{control}$ (Clements, 1990). Finalmente construimos un gráfico comparando la variación en M (m después de las espigas de calcio con respecto al control) a los cambios de la variación en la amplitud de los EPSCs ($1/CV^2$) en cada célula. En este gráfico, los valores si siguen una diagonal y si los valores de $1/CV^2$ se mantienen por encima de 1 indica que la potenciación de los EPSCs tiene un origen presináptico.

IV. RESULTADOS

1. Las neuronas piramidales de capa V generan espigas de Calcio mediadas por NMDARs y CCVDs de tipo L en presencia de PiTX.

Las neuronas piramidales de capa V pueden inducir espigas de Ca^{2+} en presencia de Ach (Nuñez y cols, 2012). Para determinar si las neuronas piramidales de capa V tenían la capacidad de generar espigas de Ca^{2+} en presencia de PiTX, registrábamos una neurona piramidal de capa V y colocábamos un estimulador cerca de las dendritas basales a nivel de la capa V_B ó capa VI ($\pm 100 \mu\text{m}$ del soma) (Fig. 2A) y observamos la respuesta a estímulos de alta intensidad bajo condiciones de inhibición local bloqueada con PiTX. La estimulación a intensidades altas desde capas inferiores provocó la aparición de espigas de Ca^{2+} en el 90 % de las neuronas registradas. Éstas espigas de Ca^{2+} estaban compuestas por un EPSP previo al que le seguía un potencial de acción (ó a veces varios) y una siguiente despolarización lenta (Fig. 2B).

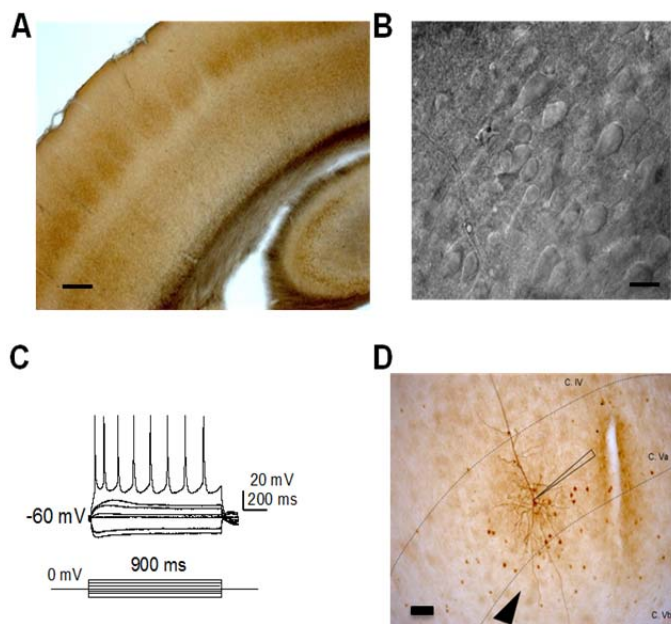


Figura 1. Identificación de las neuronas piramidales de capa V en la corteza de barriles. A, Imagen DIC de la corteza de barriles en un corte coronal, escala: barra=100 μM . B, Imagen DIC de neuronas piramidales de capa V a grandes aumentos (40X), escala: barra=10 μM . C, Registro electrofisiológico de una neurona piramidal que muestra el patrón característico de disparo de estas neuronas piramidales “regular spiking”. D, Imagen de una neurona piramidal en capa V, llenada con biocitina y revelada mediante técnica inmunológica, escala: barra=50 μM . 44

Para confirmar que estas respuestas lentas generadas dependían de entradas de Ca^{2+} realizamos registros de imagen de Ca^{2+} en paralelo al registro electrofisiológico (Fig. 2C y D). Las espigas de Ca^{2+} inducidas por liberación de acetilcolina descritas por Nuñez y colaboradores (2012), en las neuronas piramidales de corteza de barriles, dependían de la activación de canales NMDA y CCDV de tipo L. Con el fin de comprobar si se trataban de espigas de Ca^{2+} similares a las observadas por Nuñez y cols, analizamos el efecto sobre las espigas con antagonistas de los NMDARs (D-APV 50 μM) y de los CCDV tipo L (Nifedipina 20 μM). Observamos que la espiga de calcio se reducía casi en un 50% en presencia de D-APV y en su totalidad cuando aplicábamos también en el baño Nifedipina (Fig. 3).

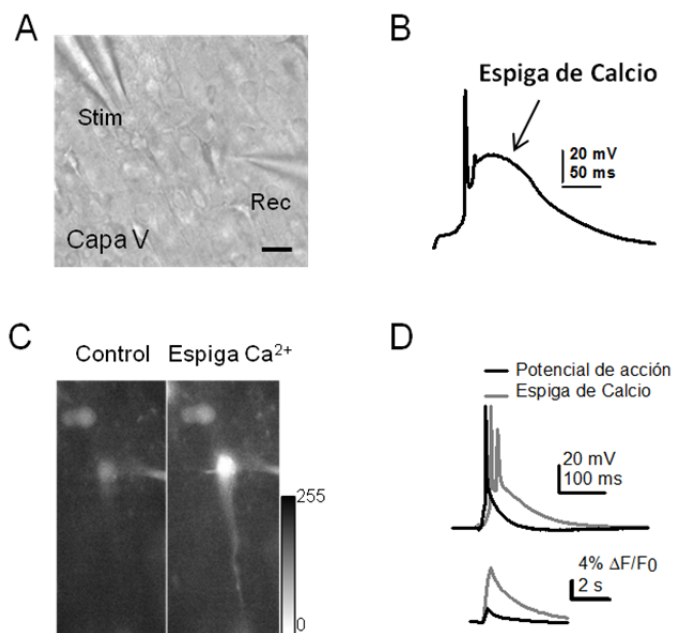


Figura 2. Las neuronas piramidales generan espigas de Ca^{2+} en rodajas des-inhibidas. A, Imagen DIC mostrando el electrodo de registro (Rec) y el electrodo de estimulación (Stim), escala: barra=20 μM . B, Registro electrofisiológico de una espiga de Ca^{2+} generada en una neurona piramidal de capa V. C, Aumentos de calcio durante la generación de un potencial de acción (PA) y de una espiga de calcio. D, Medidas de los aumentos de calcio de un PA y de una espiga de Ca^{2+} .

2. Las espigas de Ca^{2+} inducen potenciación a largo plazo de las sinapsis glutamatérgicas.

Para estudiar si la generación de espigas de Ca^{2+} por estimulación de las dendritas inducía algún tipo de plasticidad, diseñamos un protocolo de estimulación a alta intensidad, con una frecuencia del estímulo baja (0.2 Hz) y una duración de 5 minutos, con una generación de 50 ± 10 espigas. La generación de 50 ± 10 espigas de Ca^{2+} inducía potenciación de los EPSCs a largo plazo (LTP) en las sinapsis excitadoras de las neuronas piramidales de capa V registradas. Los EPSCs basales

registrados en control a una intensidad subumbral tenían una amplitud del pico (50 ± 50 pA) y se potenciaban en una media de $210 \pm 45.50\%$ del control ($p < 0.05$, $n = 23$), y llegaban a una amplitud potenciada estable a los 20-25 minutos desde el inicio del protocolo inductor (50 ± 10 espigas de Ca^{2+}) (Fig. 4A). Posteriormente analizamos el número de repeticiones necesario para la inducción de la LTP. Para ello fuimos disminuyendo el número de estimulaciones en el protocolo de inducción y comprobamos que eran necesarias la generación de 20 espigas a 0.2 Hz (Fig. 4B). Un número menor de 20 espigas no induce plasticidad. El número necesario de espigas de Ca^{2+} para la inducción de esta LTP es de 20 o más.

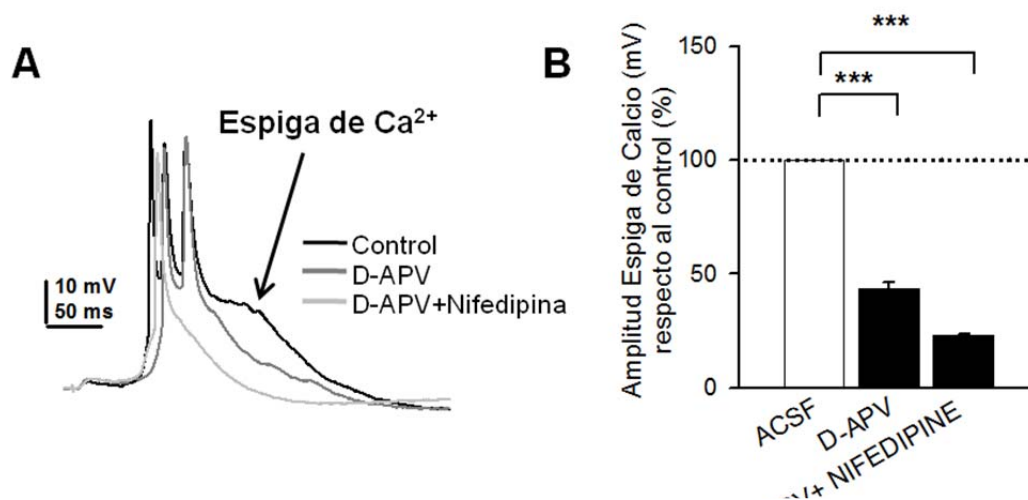


Figura 3. Espigas de Ca^{2+} dependientes de la activación de NMDARs y CCVDs. A, Representación gráfica de una espiga de Ca^{2+} inducida por estimulación de las dendritas de una neurona piramidal de capa V, en condiciones control (trazo negro), en presencia de D-APV (trazo gris oscuro) y en presencia de D-APV + Nifedipina (trazo gris claro). B, Gráfico resumen del porcentaje de reducción de la amplitud de la espiga de calcio bajo las tres condiciones representadas en A.

Los registros se realizaron a un potencial de membrana de $V_H \sim 60$ mV. A este potencial de membrana los NMDAR están bloqueados por Mg^{2+} (Mayer y cols, 1984). Por esta razón en nuestros registros los EPSCs controles están compuestos mayoritariamente por corrientes mediadas por AMPAR mientras que las corrientes mediadas por NMDA no las observábamos. Ya sabíamos que la corriente mediada por los AMPAR se potenciaba (Fig. 4A), para investigar si las corrientes mediadas por NMDARs eran potenciadas por la generación de espigas de Ca^{2+} , realizamos los experimentos en condiciones de ACFS libre de Mg^{2+} . En estas condiciones los NMDARs no estaban bloqueados por el Mg^{2+} extracelular, así tendíamos los NMDARs susceptibles de activarse con la estimulación sináptica y podíamos medir las corrientes mediadas por los NMDARs. Para demostrar que teníamos un componente NMDA,

aplicamos CNQX (50 μ M) y observamos una reducción del área de los EPSCs registrados. El tiempo al que observábamos el componente NMDA, fue a los 80 ms, partiendo desde el artefacto de estimulación como tiempo=0 (Fig. 5B). En esta condición pudimos determinar que los dos componentes, AMPA y NMDA, se potenciaban (AMPA se potencia en un $154.21 \pm 6.40\%$ del control, $p < 0.05$, $n=3$ y NMDA se potencia en un $138.38 \pm 2.51\%$ del control, $p < 0.05$, $n=3$).

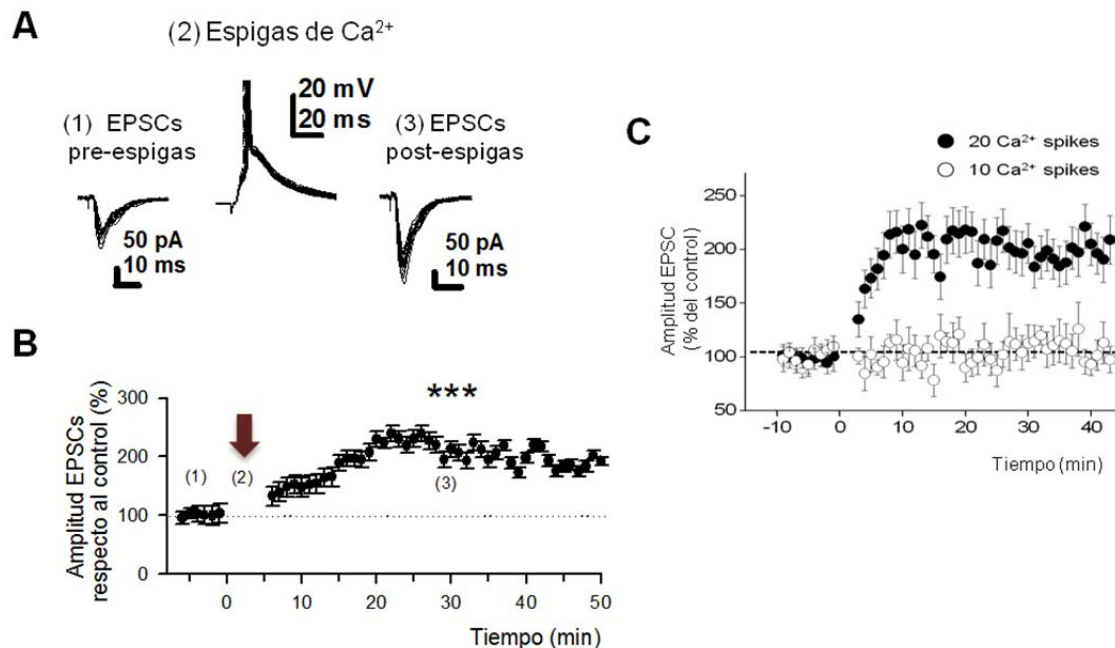


Figura 4. Las espigas de Ca^{2+} inducen LTP. A, Superposición gráfica de los registros electrofisiológicos de los EPSCs registrados en control (1) y después del protocolo de inducción (3) y las espigas de calcio generadas durante el protocolo de inducción (2). B, Curso temporal de la amplitud media de los EPSCs basales y después del protocolo de inducción (en porcentaje con respecto al control). C, Número de espigas necesarias para la inducción de la LTP.

3. La potenciación a largo plazo mediada por las espigas de calcio no depende de cambios en la probabilidad de liberación.

La expresión de la LTP en las sinapsis excitadoras puede ser originada por cambios a nivel postsináptico, aumentando el número de receptores y/o incremento en la conductancia iónica unitaria de receptores postsinápticos funcionales de AMPA (Malenka y Bear, 2004), ó por un aumento de la sensibilidad de los AMPARs al glutamato liberado (Malinow y Malenka, 2002). Sin embargo, también se ha demostrado que puede deberse a mecanismos presinápticos (Cabezas y Buño, 2006),

mediados por cambios en la probabilidad de liberación de glutamato desde la terminal presináptica.

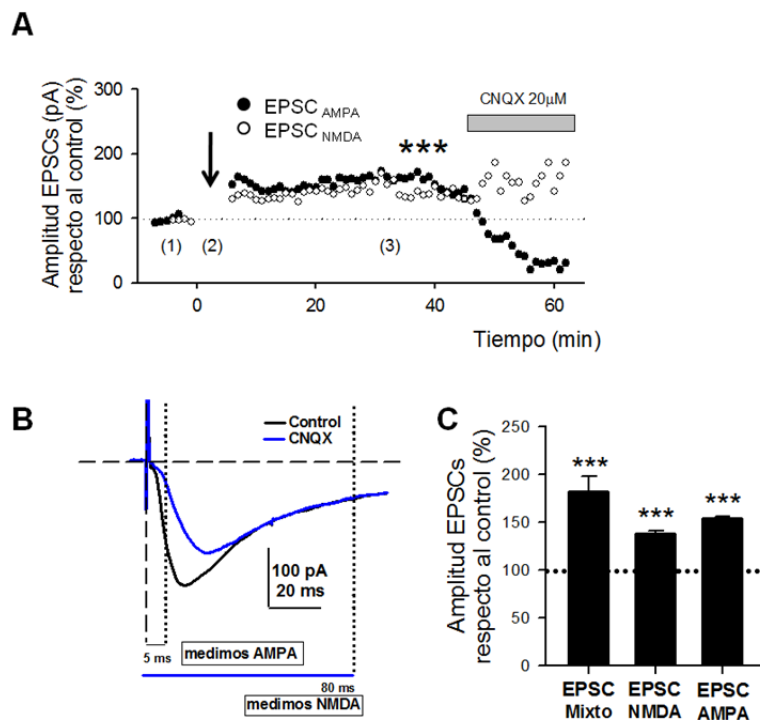


Figura 5. Potenciación de las corrientes mediadas por AMPARs y mediadas por NMDARs. A, Curso temporal de la potenciación de ambos componentes, AMPA (círculos negros) y NMDA (círculos blancos) medidos bajo la condición libre de Mg^{2+} extracelular. B, Análisis del tiempo al que medimos el componente AMPA y el componente NMDA definido por la aplicación de CNQX (trazo azul). C, Gráfico de barras resumen de la potenciación de los EPSCs mixtos, del componente del EPSC mediado por los NMDARs y del componente del EPSC mediado por los AMPARs.

Dado que tanto el componente AMPA como el NMDA se potenciaban por las espigas de Ca^{2+} , pensamos que podrían ser debido a un aumento de la probabilidad de liberación y por lo tanto se deberían observar cambios en la probabilidad de liberación (PPR). Analizamos si la LTP fue por modificaciones en la probabilidad de liberación de glutamato midiendo 1) la razón entre los pares de pulsos (estímulos subumbrales R1 y R2 separados por 90 ms (PPRs) (Fig. 6A) en los EPSCs evocados por estimulación de pares de pulsos (Fdez de Sevilla y cols, 2008). No se observaron modificaciones en la PPR durante la LTP (desde 5.1 ± 0.4 en control a 4.8 ± 0.6 a los 30 minutos después del protocolo de inducción, $p > 0.05$, $n=15$) sugiriendo que el incremento en la eficacia sináptica no fue debido a cambios en la probabilidad de liberación (Fig. 6B). 2) Se comparó el valor de $1/CV^2$ (donde CV es el coeficiente de variación y M es el valor medio de la amplitud de los EPSCs), de los EPSCs antes y después del protocolo de inducción, ya que se ha demostrado que el análisis de la distribución de $1/CV^2$ versus el valor de M, permite determinar si la inducción de la LTP es de origen pre o postsináptico (Fdez de Sevilla y cols, 2002; Cabezas y Buño, 2006).

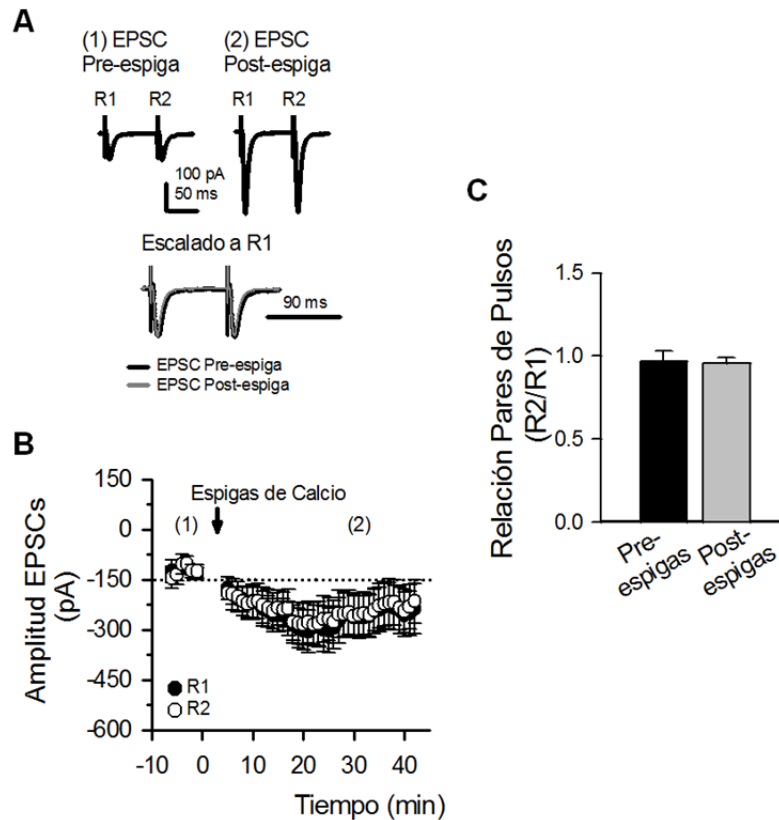


Figura 6. La LTP mediada por espigas de calcio no es debida a cambios en la probabilidad de liberación. A, Representación de los EPSCs evocados por estimulación de pares de pulsos antes (1) y después (2) del protocolo de inducción (espigas de calcio) y trazos superpuestos y escalados a la amplitud del primer EPSC (escalado a R1). B, Representación gráfica del curso temporal del promedio de los EPSCs de los pares de pulsos; R1 (Ccírcuñlos negros) y R2 (círculos blancos) antes (1) y después (2) del protocolo de inducción. C, Gráfico de barras resumen mostrando la PPR (R2/R1 como porcentaje del control) antes y después del protocolo de inducción. Se puede observar la falta de modificaciones en la PPR.

Nuestros datos mostraban que los valores de la distribución de $1/CV^2$ no se agrupan siguiendo una diagonal y que el valor de $1/CV^2$ es mayor que 1.0, indicando que la LTP no fue mediada por cambios en la probabilidad de liberación (Fig. 7). Por último, 3) para confirmar que esta LTP fue mediada postsinápticamente, registramos en fijación de voltaje las respuestas evocadas por una breve aplicación local de glutamato (puff de glutamato, 1mM) aplicado en las dendritas basales cerca del soma (50-100 μ m) de la neurona piramidal de registro. Este glutamato mediaba corrientes, lo cual baipaseaba el componente presináptico de la transmisión sináptica. Fueron potenciadas por el protocolo de inducción, tanto las respuestas al puff de glutamato ($169.24 \pm 23.77\%$ del control, $p < 0.05$, $n = 6$), como los EPSCs ($166.50 \pm 22.38\%$ del

control, $p < 0.05$, $n = 6$) registrados ambos en las mismas neuronas, (Fig. 8). Tomando en conjunto, los resultados anteriores sugieren que la LTP inducida por espigas de Ca^{2+} es mayormente mediada por a través de mecanismos postsinápticos, y se descartan cambios en la probabilidad de liberación.

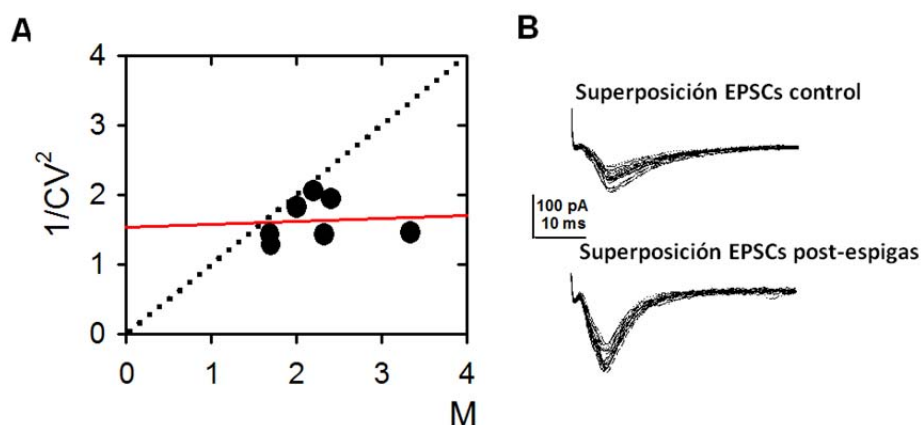


Figura 7. Análisis del coeficiente de variación. A, Representación del coeficiente de variación con respecto al tamaño de los EPSCs. B, Superposición de los EPSCs antes (arriba) y después de las espigas de calcio (abajo).

4. La potenciación sináptica requiere aumentos de Ca^{2+} postsinápticos.

En la figura 2 mostrábamos que la estimulación de las dendritas de las neuronas piramidales de capa V desde capas inferiores en presencia de PiTX, provocaba aumentos de Ca^{2+} en la neurona de registro. Además se ha demostrado que éste protocolo de estimulación inducía potenciación a largo plazo de las sinapsis excitadoras de éstas neuronas. Por lo tanto, nos propusimos investigar si la potenciación sináptica inducida por este protocolo de estimulación era dependiente de aumentos de Ca^{2+} citosólicos de la neurona postsináptica. Para ello utilizamos diferentes manipulaciones farmacológicas. En primer lugar bloqueamos específicamente las elevaciones de Ca^{2+} en la neurona de registro mediante la inclusión de BAPTA (50 mM) en la pipeta de registro. En esta condición conseguimos, con la estimulación de las dendritas, una espiga de Ca^{2+} similar a la espiga control pero sin aumentos de la concentración de Ca^{2+} citosólico. De este modo no se indujo la LTP, la amplitud de los EPSCs a los 30 minutos después del protocolo de inducción no tuvo cambios significativos ($103.0 \pm 5.7\%$ del control, $p > 0.05$, $n = 12$),

(Fig. 9). Con este resultado sabíamos que los aumentos de Ca^{2+} citosólicos asociados a las espigas son necesarios para la inducción de la LTP.

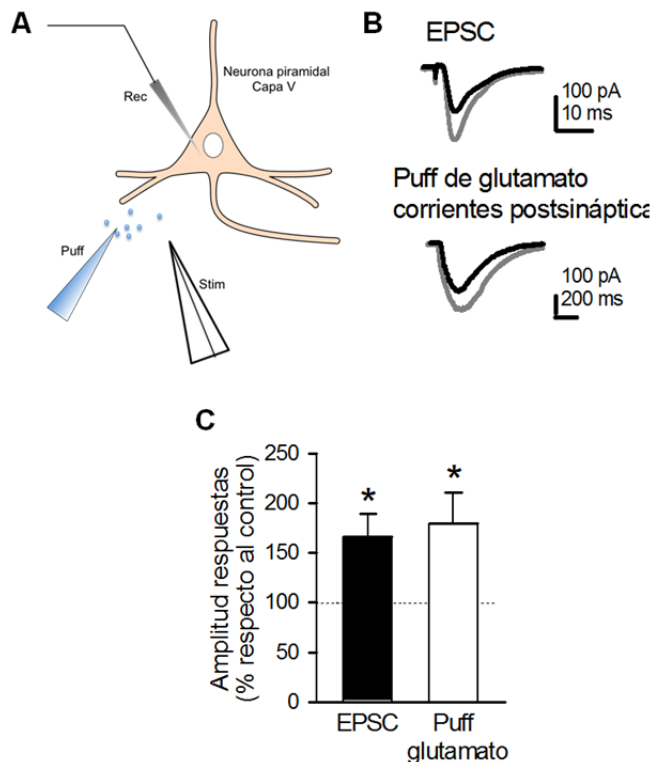


Figura 8. Potenciación de las corrientes mediadas por aplicación de glutamato exógeno. A, Imagen DIC del registro de una neurona piramidal con un electrodo de registro (Rec), un electrodo de estimulación (Stim) y una pipeta de Puff llena con glutamato (Puff). B, Representación de los EPSCs generados por estimulación eléctrica y las corrientes generadas por puff de glutamato, controles (trazos grises) y después de las espigas de calcio (trazos negros) registrados en la misma neurona. C, Resumen en gráfico de barras de la amplitud media de los EPSCs y de las corrientes generadas por el Puff de glutamato (porcentaje con respecto al control).

Una fuente importante de aumentos de Ca^{2+} citosólico también podría ser provocada por la salida de este ión desde los reservorios intracelulares mediante la activación de receptores de Ryanodina y/o los receptores de IP3 (Murphy y Miller, 1989). Con el fin de analizar si la inducción de la plasticidad era dependiente de la liberación de Ca^{2+} desde el retículo, bloqueamos selectivamente sus receptores. Aplicamos un antagonista selectivo para los receptores de Ryanodina (Ruthenium red, 400 μM) en el interior de la pipeta de registro. En este caso la espiga de Ca^{2+} era similar a la control, sin embargo la LTP de los EPSCs fue abolida por completo ($98.88 \pm 11.33\%$ del control, $p > 0.05$, $n=6$) (Fig. 10A). Resultados similares fueron obtenidos cuando bloqueamos selectivamente los receptores IP3 mediante la aplicación en la pipeta de registro de un antagonista (Heparina 5mg/ml) en la solución intracelular ($86.28 \pm 9.43\%$ del control, $p > 0.05$, $n=6$) (Fig. 10B).

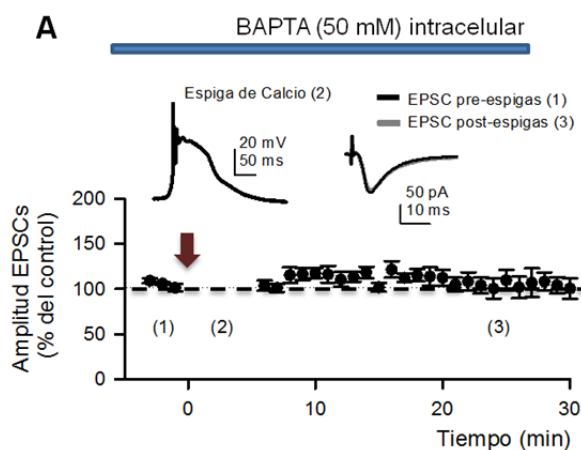


Figura 9. La LTP por espigas de calcio requiere el aumento del calcio citosólico postsináptico. A, Arriba, dcha. Representación de la espiga de calcio registrada en las neuronas piramidales de CV con Bapta (50 mM) en la pipeta de registro. Izq. Representación de los EPSCs registrados antes (trazo negro) y después (trazo gris) y a los 30 minutos del protocolo de inducción. Abajo. Representación del curso temporal del promedio de los EPSCs (en % del control) antes (1) y después (2) del protocolo de inducción (3).

La espiga de Ca^{2+} inductora de esta LTP es dependiente del flujo de Ca^{2+} desde la activación de los NMDAR y de los CCDVR de tipo L (Fig. 3), por lo que nos preguntamos si la LTP también dependía de la activación de estos receptores. Realizamos el protocolo con los CCDV de tipo L bloqueados con un antagonista de estos receptores (Nifedipina 20 μM) aplicado en el baño, y observamos que la LTP no se inducía ($77.1 \pm 5\%$ del control, $p > 0.05$, $n=4$) (Fig. 11A). Realizamos lo mismo pero esta vez en presencia de antagonistas para los NMDAR (D-APV 50 μM) aplicado también en el baño, obteniendo en este caso una depresión a largo plazo (LTD) de los EPSCs ($56.4 \pm 2.7\%$ del control, $p < 0.05$, $n=5$) (Fig. 11B). Estas dos condiciones causaban una fuerte reducción de la amplitud de la espiga y se bloqueaba la inducción de la LTP. El D-APV es un antagonista aplicado en el baño, por lo que bloqueaba los NMDAR de todas las neuronas de la rodaja. Con el propósito de averiguar si la LTP dependía sólo de la activación de los NMDAR de la célula postsináptica, aplicamos un antagonista en la solución intracelular que únicamente bloqueaba los NMDAR de nuestra célula de registro (MK801, 80 μM), la LTP desaparecía, pero a diferencia de la LTD producida en presencia de D-APV, los EPSCs no cambiaban con respecto al control ($96.45 \pm 7.97\%$ del control, $p > 0.05$, $n=7$) (Fig. 12C).

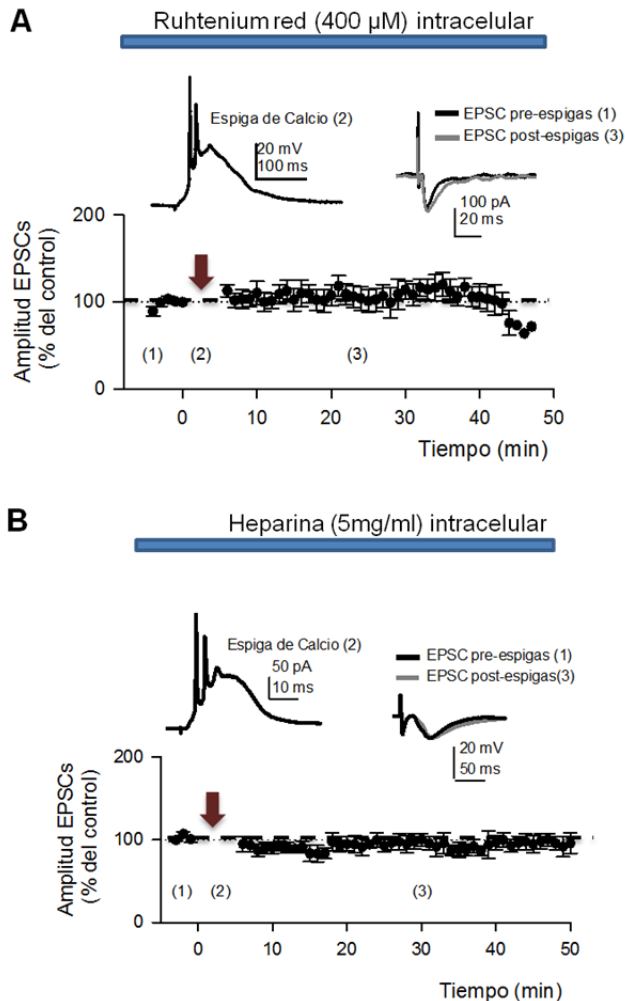


Figura 10. La LTP requiere la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares. A. Arriba, Representación de la espeja de calcio registrada en presencia de Ruthenium Red (400 μM) en la pipeta de registro y promedio de los EPSCs registrados en esta condición antes (trazo negro) y después del protocolo de inducción (trazo gris). Abajo, Representación del promedio del los EPSCs durante el curso temporal antes (1) y después (3) del protocolo de inducción (2). B, Igual que en A, pero con Heparina (5mg/ml) en la solución intracelular.

En conclusión, estos resultados indican que las elevaciones de calcio en la neurona postsináptica mediada por la activación de los NMDAR, los CCDV y por el Ca^{2+} liberado desde reservorios del retículo endoplasmático son necesarias para la potenciación sináptica inducida por este protocolo de generación de espigas de Ca^{2+} a baja frecuencia.

5. La LTP es dependiente de la activación de los receptores de Acetilcolina de tipo M3 y Nicotínicos y de receptores de glutamato metabotrópicos de tipo R1.

En el apartado anterior se ha demostrado que la LTP inducida por estas espigas, dependía de la activación de RyanodinaRs e IP3Rs. Esta descrito un nuevo tipo de plasticidad sináptica excitadora, en células piramidales de CA1 de hipocampo, no *hebbiana*, inducida por la producción intracelular de IP3 mediada por la activación de mAChRs de tipo M1. Este tipo de plasticidad se denominó LTP_{IP3} (Fdz de Sevilla y

cols, 2008).

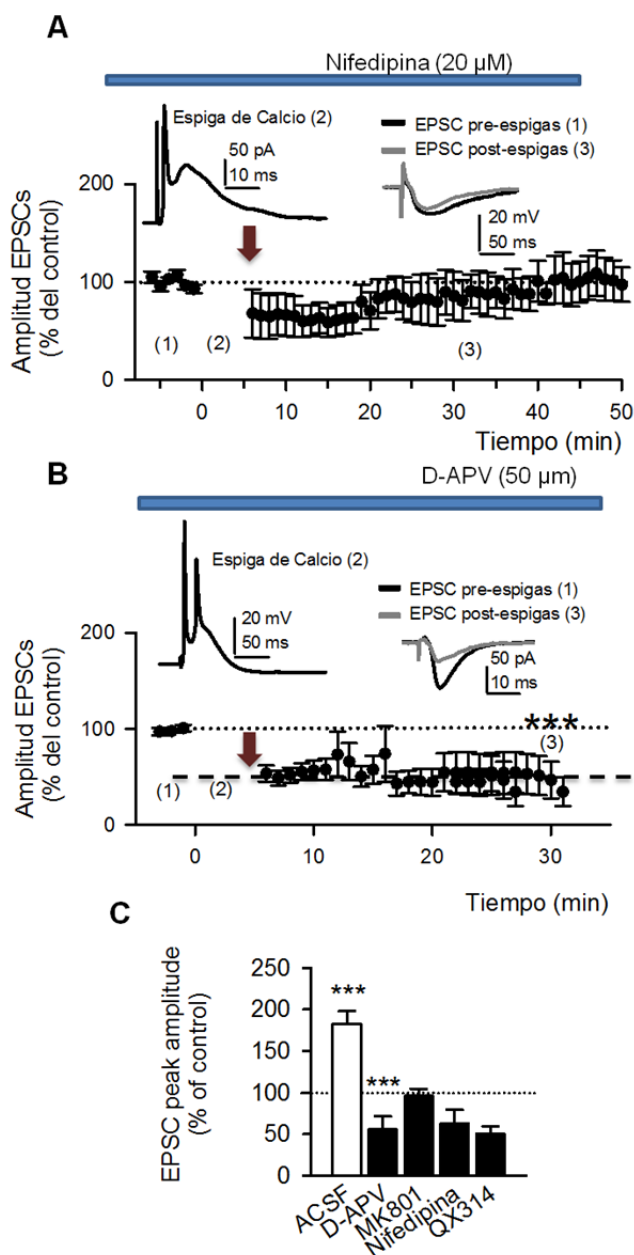


Figura 11. La LTP requiere la activación de los NMDARs y los CCDVs.

A. Arriba, Representación de la espiga de calcio registrada en presencia de Nifedipina (20 μ M) en el baño promedio de los EPSCs registrados en esta condición antes (trazo negro) y después del protocolo de inducción (trazo gris). Abajo, Representación del curso temporal del promedio de los EPSCs antes (1) y después (3) del protocolo de inducción (2). B, Igual que en A pero en presencia de D-APV (50 μ M) en el baño. C, Gráfico de barras resumen de la amplitud promedio de los EPSCs (en porcentaje con respecto al control) en situación control (ACFS), con Nifedipina, D-APV y con un inhibidor de los NMDARs en la solución de registro (MK801) y con un inhibidor de las conductancias de Na^{2+} (QX314) en la solución intracelular.

Es factible que la LTP inducida por espigas de Ca^{2+} pudiera estar mediada por mecanismos similares, por lo que, el siguiente experimento que realizamos fue analizar si éstos receptores estaban participando en este tipo de LTP. Nuestros resultados mostraron que esta LTP si dependía de la activación de receptores colinérgicos, ya que en presencia de un antagonista no selectivo de éstos receptores mAChRs (Atropina 10 μ M) se bloqueaba la LTP (Fig. 12A). Pasamos a analizar cual/es de los receptores colinérgicos eran los implicados. Para ello utilizamos antagonistas específicos y nuestros resultados mostraban que los receptores nicotínicos participaban en la inducción de la LTP, porque cuando eran bloqueados con MMA (10

μM) / MLA (50 μM) no obtuvimos LTP ($102.23 \pm 4.55\%$ del control, $p > 0.05$, $n=5$). También se precisaba la activación de los mAChR de tipo M3, ya que su bloqueo con DAU5884, (1 μM) no generó LTP ($103.25 \pm 4.32\%$ del control, $p > 0.05$, $n=5$) (Fig. 12B y C) Sin embargo, no fue requerida la activación de los mAChR de tipo M1, cuando los bloqueábamos con Pirenzepina 75 μM , se inducía LTP ($167.74 \pm 48\%$ del control, $p < 0.05$, $n=7$).

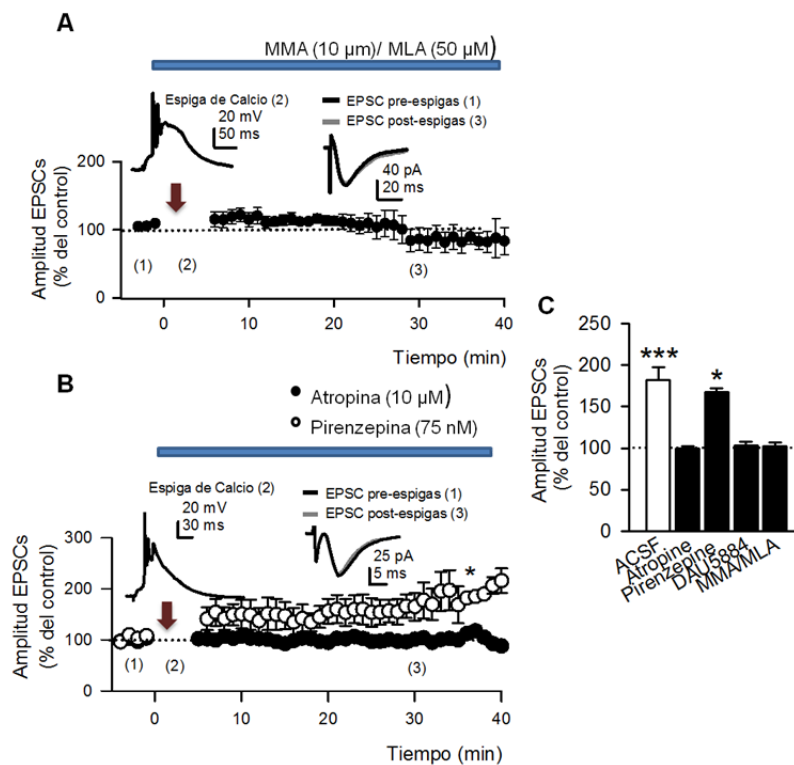


Figura 12. Participación de receptores colinérgicos en esta forma de plasticidad. A. Arriba, Representación de la espiga de calcio registrada en presencia de MMA (10 μM)/MLA (50 μM) en el baño promedio de los EPSCs registrados en esta condición antes (trazo negro) y después del protocolo de inducción (trazo gris). Abajo, Representación del curso temporal del promedio de los EPSCs antes (1) y después (3) del protocolo de inducción (2). B, Igual que en A pero en presencia de un inhibidor no específico de los receptores colinérgicos (Atropina, 10 μM) en el baño, y un inhibidor específico de los receptores muscarínicos de tipo 1 (Pirenzepina, 75 nM). C, Gráfico de barras resumen de la amplitud promedio de los EPSCs (en porcentaje con respecto al control) en situación control (ACFS), con Atropina, Pirenzepina, MMA/MLA y con un inhibidor específico de los receptores muscarínicos de tipo 2, todos ellos aplicados en el baño.

Las terminales que estimulamos desde las capas inferiores, para generar los EPSCs en las neuronas piramidales de capa V de la corteza de barriles, son en su mayoría glutamamérgicas. Por esta razón y por ser necesaria la activación de los NMDAR (Fig. 11B) nos planteamos si el glutamato también estaba involucrado en la activación de algún otro receptor glutamatérgico, o por el contrario, solo participaba en

esta LTP mediante activación de AMPAR y NMDAR. Primero bloqueamos de manera no selectiva los mGluRs con un antagonista no específico (MCPG 0.1 mM) y en los resultados observamos que la inhibición de éstos receptores prevenía la generación de la LTP ($103.0 \pm 5.7\%$ del control, $p > 0.05$, $n=4$) (Fig.13A). Posteriormente quisimos averiguar que subtipo de receptor metabotrópico de glutamato podría estar mediando esta potenciación de las sinápsis excitadoras. Como describimos en el apartado 3, la LTP que estamos estudiando está mediada por mecanismos postsinápticos. Se sabe que los receptores metabotrópicos de glutamato principalmente presentes en el compartimento postsináptico de la sinapsis son los mGluR de tipo R1 y R5 mGluR1 y R5), ambos acoplados a proteínas Gq (excitadores, Grupo I), mientras que los de tipo R2 y R3 se encuentran en la presinapsis, acoplados ambos a proteínas Gi, (inhibidores, Grupo II) y los del Grupo III también se encuentran en la terminal presináptica (Luján, 2005).

Por esto, lo más plausible es que si algún mGluR estaba participando en esta LTP fuese el mGluR1 ó R5. En nuestros resultados se observó que la LTP estaba completamente ausente cuando realizábamos el protocolo en presencia de los mGluR1 bloqueados (LY367385, 50 μ M) ($92.33 \pm 25.0\%$ del control, $p > 0.05$, $n=5$), pero no en presencia de los mGluR5 bloqueados (MPEP, 5 μ M, $173.56 \pm 7.06\%$ del control, $p < 0.05$, $n=4$) (Fig. 13 B). Con estos datos sabíamos la necesidad de la activación de los mGluR1 para la LTP pero no podemos descartar que otros mGluRs de otros grupos (*ver Introducción, apdo; receptores de glutamato*) puedan estar participando.

6. Mecanismos intracelulares que subyacen a la LTP inducida por espigas de Ca^{2+} .

La actividad de las enzimas CaMKII, PKC y PKA, está relacionada con receptores acoplados a proteínas G y con cambios persistentes en la plasticidad sináptica (Malenka y Nicoll, 1999; Fdez de Sevilla y cols, 2008, Fdez de Sevilla y Buño, 2010). Los receptores metabotrópicos implicados en esta LTP están acoplados a proteínas G, tanto los M3-AchRs como los mGluR1. Por tanto, analizamos los efectos de bloquear en la célula de registro, la actividad de dichas enzimas y de las proteínas G con inhibidores específicos.

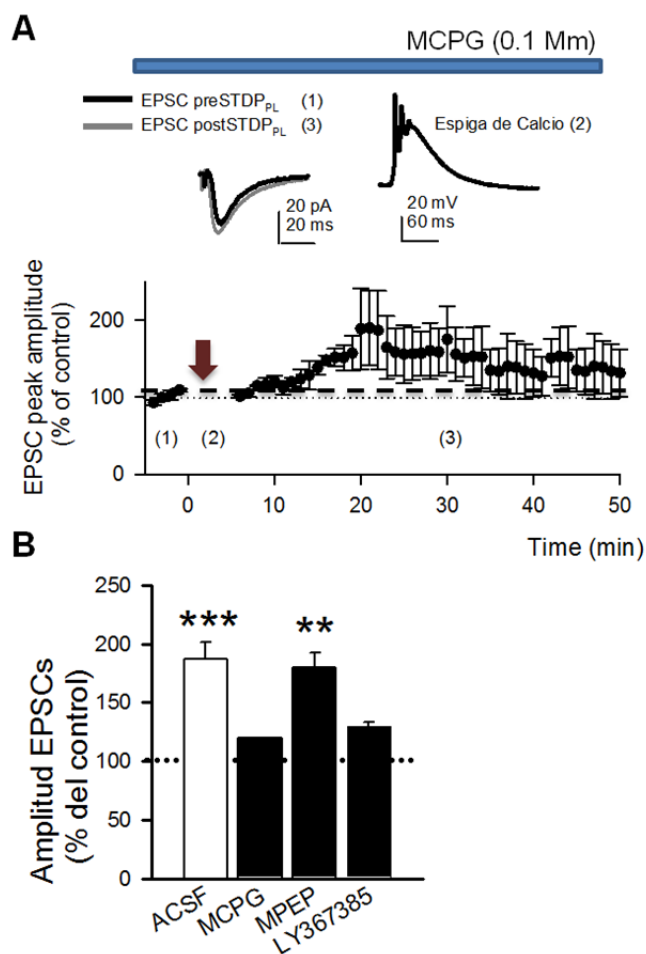


Figura 13. La activación de los mGluR1 es esencial para la inducción de la LTP. A. Arriba, Representación del registro de la espiga de calcio bajo el bloqueo de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) con MCPG (0.1 mM) y representación de los EPSCs antes (trazo negro) y a los 30 minutos (trazo gris) del protocolo de inducción. Abajo, Curso temporal de los cambios en la amplitud de los EPSCs antes (1) y después (3) (como % del control), inducido por las espigas de calcio (2). B, Igual que en A pero bajo el bloqueo selectivo de los mGluR de tipo 1 (círculos negros) con LY367385 (50 μ M) y bajo el bloqueo selectivo de los mGluR de tipo 5 (círculos blancos) con MPEP (5 μ M). C, Gráfico de barras resumen en situación control (ACFS), MCPG, LY367385 y MPEP.

En primer lugar usamos GDP β s, inhibidor de las proteínas G (1 Mm), en la solución intracelular y se suprimía la generación de la LTP (amplitud de los EPSCs con respecto al control: $101.60 \pm 6.30\%$, $p > 0.05$, $n=6$) (Fig. 14), este resultado indicaba que era necesaria la activación de proteínas G para la generación de la LTP (Fig, 15A).

Posteriormente inhibimos la PKC con chelerythrine (5 μ M) sin observar modificaciones de la LTP con respecto a los controles ($191.47 \pm 30.13\%$, $p < 0.05$, $n=4$) (Fig. 15A). Por consiguiente este enzima no participaba en la generación de este tipo de plasticidad. Por el contrario, el estudio de los efectos de la inhibición de la PKA con el inhibidor H89 dihydrochloride (10 μ M) impidió la aparición de la LTP después del protocolo de estimulación, ($92.40 \pm 4.18\%$, $p > 0.05$, $n=4$) (Fig. 15A). Estos datos demuestran la participación de la PKA en la ruta intracelular activada por las espigas de Ca^{2+} . También se empleó el péptido AIP (5 μ M), que bloqueaba la actividad de la CaMKII e impedía la inducción de la LTP (Fig.15B), en este caso analizamos tanto la

potenciación mediada por AMPAR y la mediada por NMDAR, bloqueándose ambas ($93.37 \pm 9.82\%$ y $104 \pm 17.68\%$ respectivamente, $p < 0.05$, $n = 4$) (Fig. 15C).

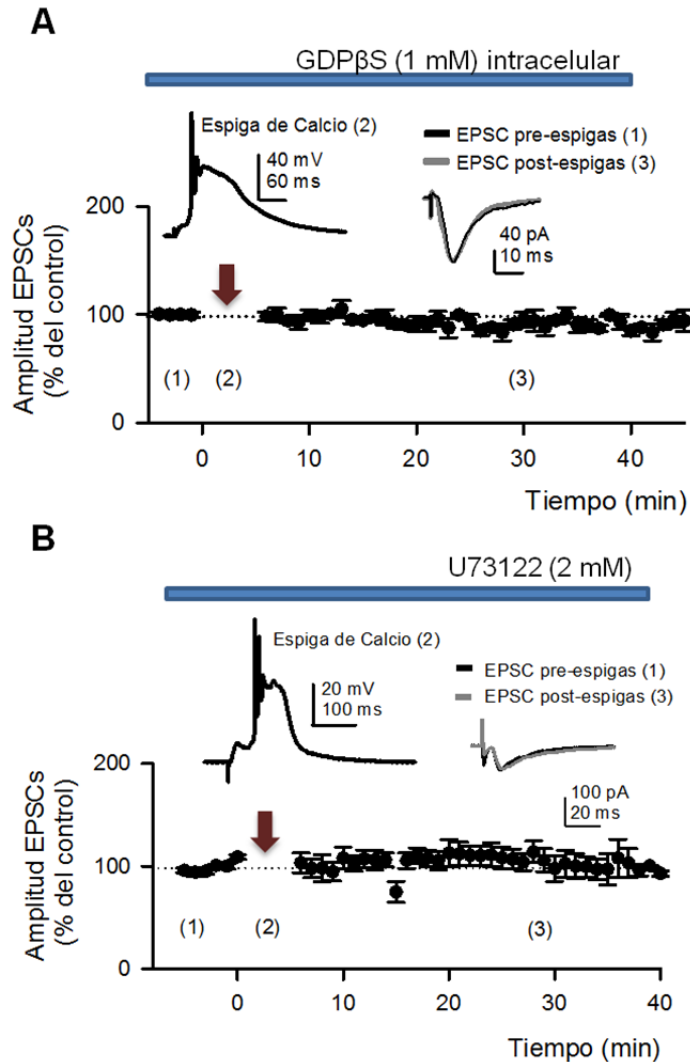


Figura 14. La activación de proteínas G y de la PLC son necesarias para la inducción de la LTP. A. Arriba, Representación del registro de la espiga de calcio bajo el bloqueo de las proteínas G con $\text{GDP}\beta\text{S}$ (1 mM) y representación de los EPSCs antes (trazo negro) y a los 30 minutos (trazo gris) del protocolo de inducción. Abajo, Curso temporal de los cambios en la amplitud de los EPSCs antes (1) y después (3) (como % del control), inducido por las espigas de calcio (2). B, Igual que en A pero bajo el bloqueo de la PLC (U73122, 2mM).

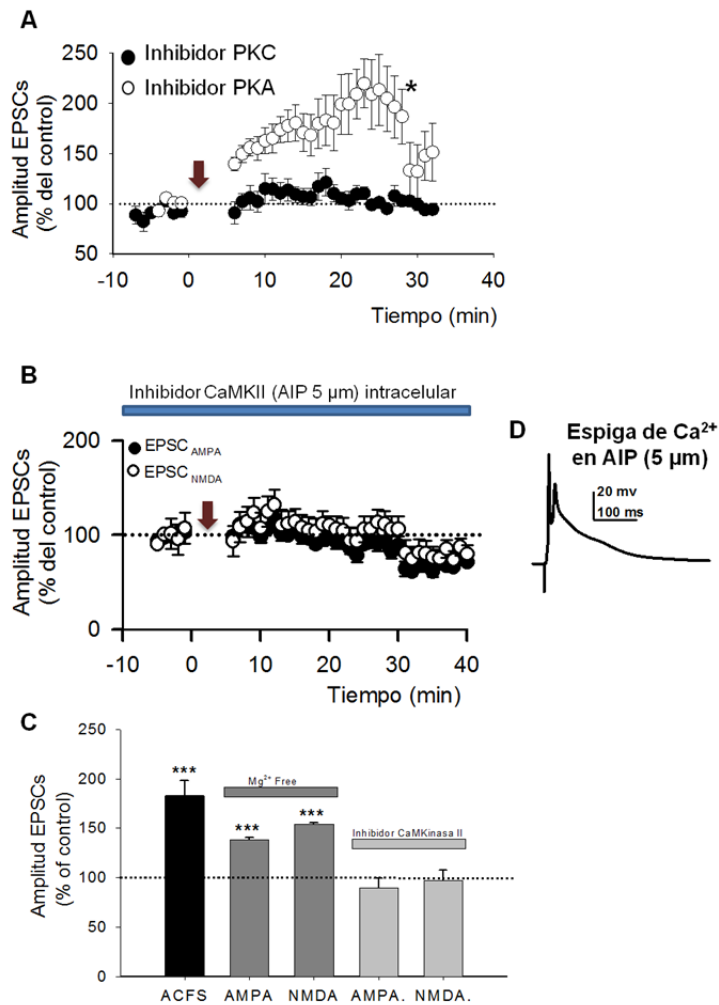


Figura 15. La CaMKII y la PKA son responsables de la activación de rutas intracelulares que inducen esta LTP. A, Curso temporal de los cambios en la amplitud de los EPSCs antes (1) y después (3) (como % del control), inducido por las espigas de calcio (2) con las proteínas kinasas C bloqueadas (con cheletythrine, 5 μ M) (círculos negros) y con las proteínas kinasas A bloqueadas (con H89, 10 μ M) (círculos blancos). B, Igual que en A, pero en este caso con las proteínas CaMKII bloqueadas (con AIP, 5 μ M), en esta condición registramos en condiciones libres de Mg^{2+} bloqueándose la potenciación mediada tanto por los AMPARs como por los NMDARs. C, Representación de espigas de calcio registradas en cada una de las condiciones anteriores. D, Grafico de barras resumen de los cambios en los EPSCs (en % con respecto al control) en ACFS, en condiciones libres de Mg^{2+} y en condiciones libres de Mg^{2+} con AIP (5 μ M).

Por lo tanto, las enzimas PKA y CaMKII tienen una contribución en la generación de la LTP mediada por espigas de Ca^{2+} , mientras que la PKC no parece participar en ella.

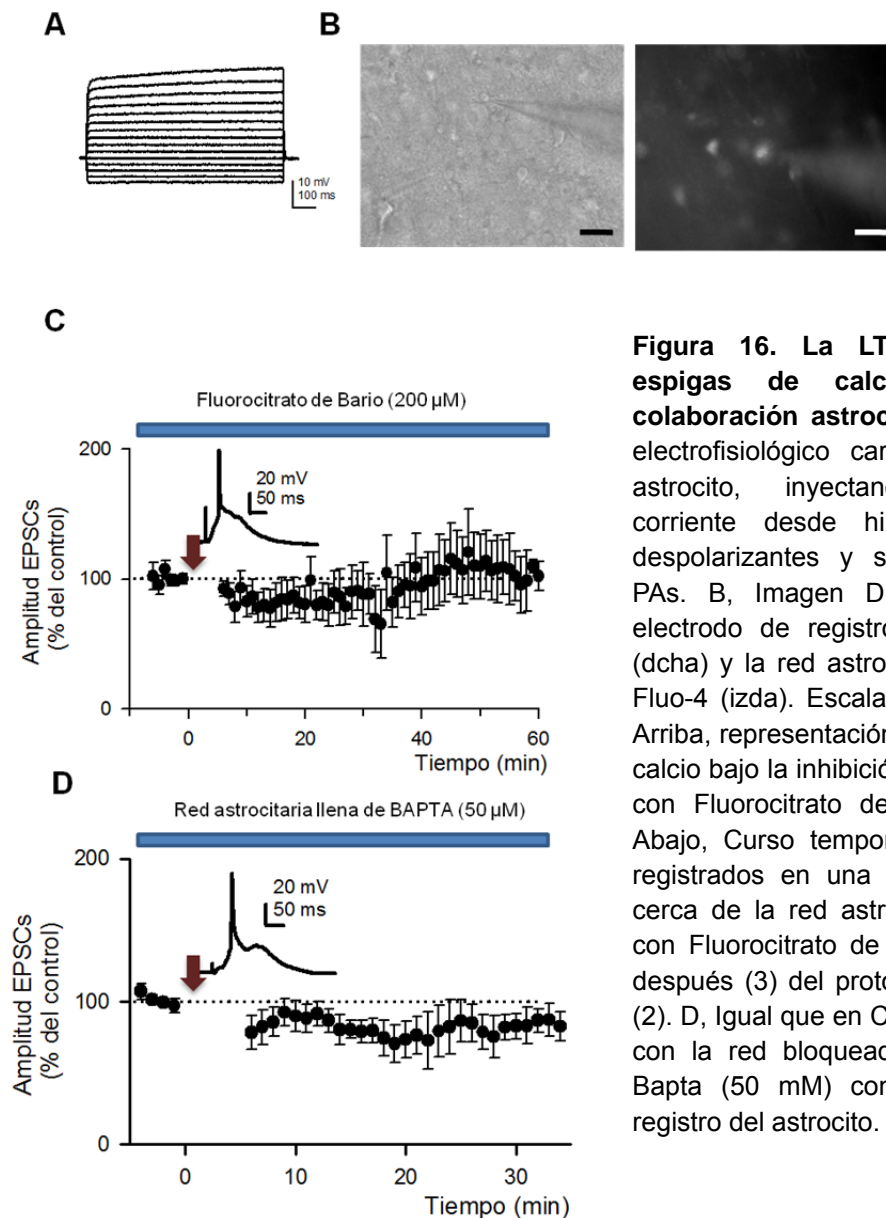


Figura 16. La LTP inducida por espigas de calcio requiere la colaboración astrocitaria. A, Registro electrofisiológico característico de un astrocito, inyectando pulsos de corriente desde hiperpolarizantes a despolarizantes y sin generación de PAs. B, Imagen DIC mostrando un electrodo de registro en un astrocito (dcha) y la red astrocitaria llenada con Fluo-4 (izda). Escala, barra=20 μ M. C. Arriba, representación de una espiga de calcio bajo la inhibición de los astrocitos con Fluorocitrato de bario (200 μ M). Abajo, Curso temporal de los EPSCs registrados en una neurona piramidal cerca de la red astrocitaria bloqueada con Fluorocitrato de bario, antes (1) y después (3) del protocolo de inducción (2). D, Igual que en C pero en este caso con la red bloqueada por llenado de Bapta (50 mM) con el electrodo de registro del astrocito.

7. Participación de la actividad astrocitaria en la LTP inducida por espigas de calcio.

En los últimos años se ha descubierto la importancia de los astrocitos en la modulación sináptica neuronal a la que se le llamó sinapsis tripartita (Araque y cols, 1998) y su implicación en algunos tipos de plasticidad sináptica (véase *introducción; apdo Astrocitos*). Por esto pensamos que estas células gliales podrían estar implicadas en esta LTP por medio de la activación de receptores metabotrópicos. De hecho, en los resultados mostrados en el apartado anterior se demuestra que en esta LTP

mediada por espigas de Ca^{2+} , participan dos tipos de receptores metabotrópicos: M3-AchR y mGluR1, ambos acoplados a proteínas G. Estos receptores metabotrópicos pueden estar presentes en astrocitos, con lo que nos planteamos si alguno de éstos receptores estaría activando a estas células gliales. De este modo, lo primero que hicimos fue bloquear la actividad de los astrocitos de forma general aplicando en el baño una droga que reduce el metabolismo de los astrocitos dejándolos inactivos (Fluorocitrato de bario, 200 μM en el baño) (Hassel y cols, 1992). En esta condición se generaron las espigas de Ca^{2+} similares a las generadas en situación control, pero en esta condición no se indujo la LTP de los EPSCs con respecto al control: $82.94 \pm 10.68\%$, ($p>0.05$, $n=4$) (Fig. 16C).

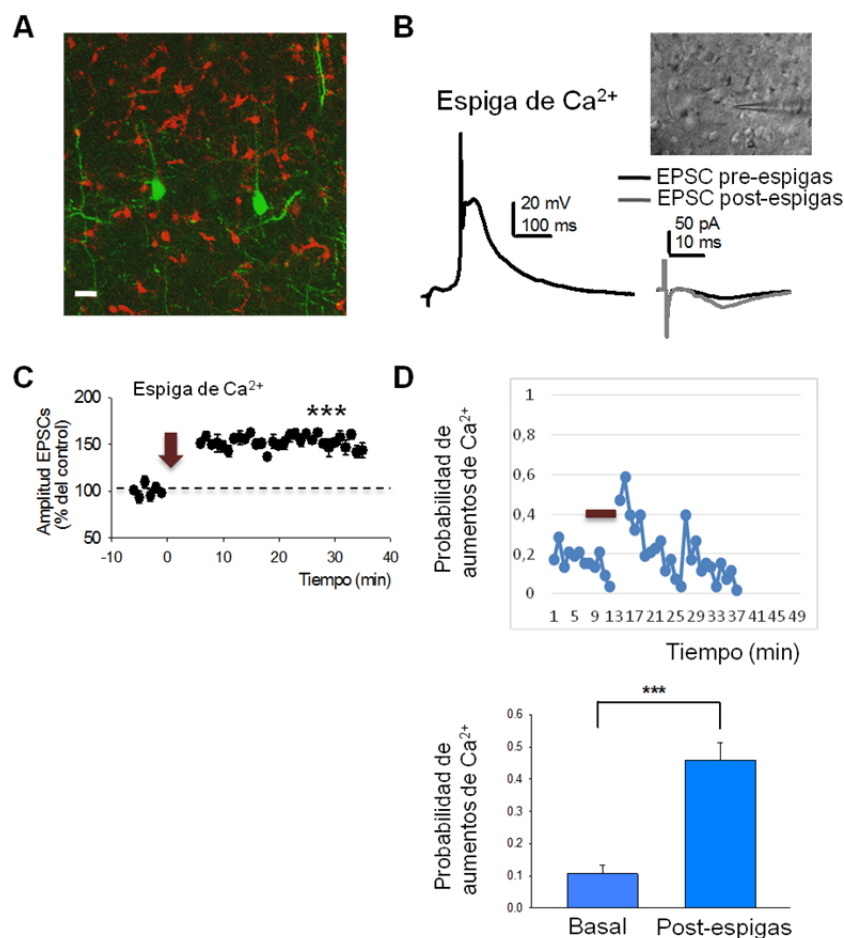


Figura 17. Las espigas de calcio inducen LTP en neuronas piramidales de la capa V de ratones Wildtype (WT). A, Imagen confocal de un ratón thy-1 mostrando las neuronas piramidales (verde) y la red astrocitaria (rojo) en la capa V de corteza de barriles. Escala, barra= 20 μm . B, Representación de una espiga de calcio registrada en ratones WT en presencia de PiTX (dcha), representación del promedio de los EPSCs registrados antes (trazo negro) y después (trazo gris) del protocolo de inducción abajo, izda) e imagen DIC del registro de una neurona piramidal de la capa V de ratón WT. C, Curso temporal del promedio de los EPSCs (% respecto al control) antes y después del protocolo de inducción. D, Probabilidad de espiga de calcio en los astrocitos de la red el campo de visión de la capa V (dcha) y grafico de barras del promedio de probabilidad de aumentos de calcio en los astrocitos (izda).

Con este resultado previo, pasamos a bloquear de forma más localizada la red astrocitaria adyacente a nuestra neurona de registro. Para ello, lo que hicimos fue registrar un astrocito reconociéndolo por su relación corriente/voltaje característica sin potenciales de acción (Figura 16A), y aplicamos en la pipeta de registro un quelante de Ca^{2+} (BAPTA 50Mm) y llenamos durante 45 minutos la red astrocitaria (Figura 16B). De esta manera dejábamos los astrocitos inactivos, ya que no podían aumentar de forma eficaz su Ca^{2+} intracelular. Bajo esta condición la LTP se abolió por completo ($90.48 \pm 10.15\%$, del control, $p > 0.05$, $n = 5$) (Figura 16D).

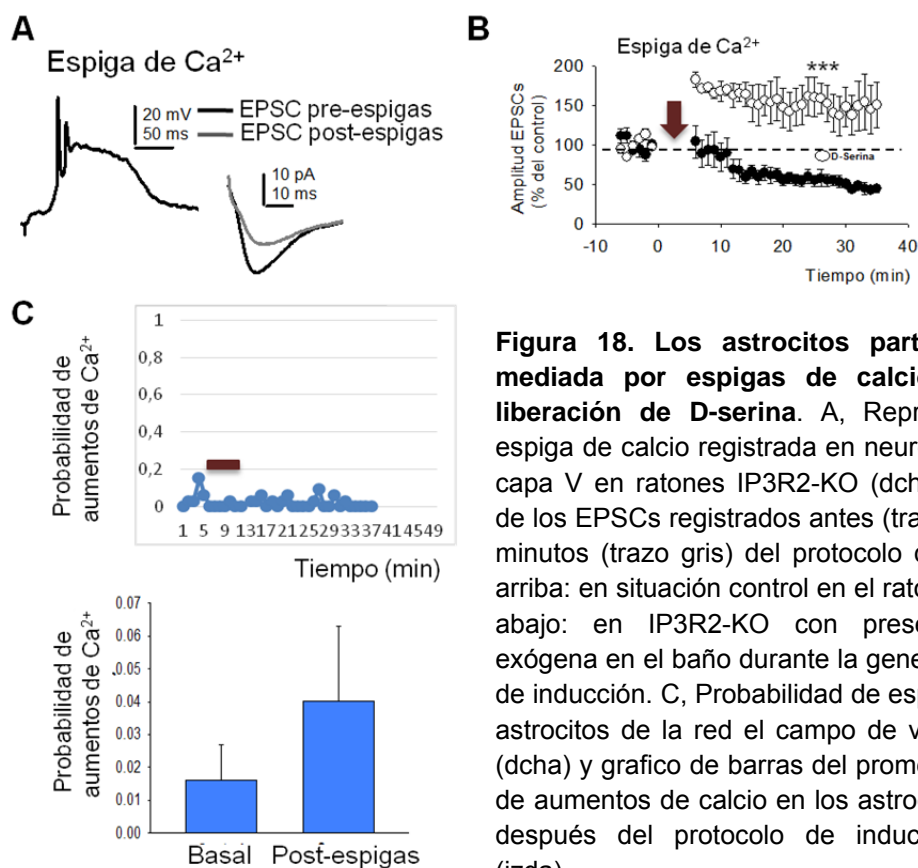


Figura 18. Los astrocitos participan en la LTP mediada por espigas de calcio a través de la liberación de D-serina. A, Representación de una espiga de calcio registrada en neuronas piramidales de capa V en ratones IP3R2-KO (dcha) y representación de los EPSCs registrados antes (trazo negro) y a los 30 minutos (trazo gris) del protocolo de inducción, izqda, arriba: en situación control en el ratón IP3R2-KO e izda, abajo: en IP3R2-KO con presencia de D-serina exógena en el baño durante la generación del protocolo de inducción. C, Probabilidad de espiga de calcio en los astrocitos de la red el campo de visión de la capa V (dcha) y grafico de barras del promedio de probabilidad de aumentos de calcio en los astrocitos antes (basal) y después del protocolo de inducción (post-espigas) (izda).

Con estos datos podíamos deducir que, para la inducción de la LTP mediada por estas espigas de Ca^{2+} , era necesaria la actividad de los astrocitos. Con la finalidad de encontrar que elemento estarían aportando los astrocitos a esta LTP pasamos a estudiar el mecanismo en ratones IP3R2-KO. Primero realizamos un control en ratones WT. En estos experimentos obtuvimos espigas de Ca^{2+} similares a las registradas en rata (Fig. 17^a y B) y los EPSCs se potenciaban con respecto al control: $154.26 \pm 6.59\%$ del control, $p < 0.05$, $n = 4$ (Fig. 17C). Para llevar un control adicional de la actividad de los astrocitos, registrábamos paralelamente la imagen de calcio de la red astrocitaria

incubando la rodaja en Fluo4-AM y se observaron variaciones de la señal de Ca^{2+} emitida por los astrocitos (Fig. 17D).

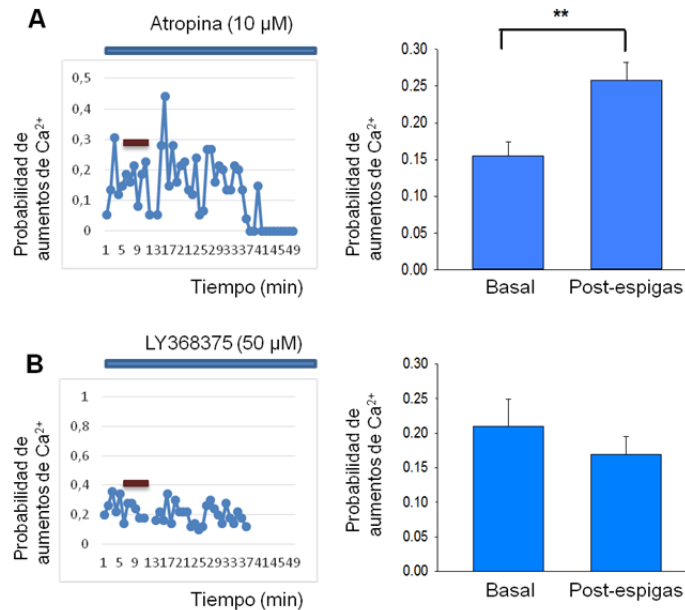


Figura 19. Los astrocitos se activan durante la generación de las espigas de calcio a través de los mGluR de tipo 1. A.dcha, Curso temporal de la probabilidad de aumentos de calcio en los astrocitos del campo visual cercanos a la neurona de registro en presencia de Atropina (10 μM), izda, Gráfico de barras del promedio de probabilidad de aumento de calcio en los astrocitos antes (basal) y después del protocolo de inducción (post-espigas). B, Igual que en A pero en presencia de la inhibición de los mGluR1 con LY367385 (50 μM).

El siguiente estudio fue investigar que ocurría en ratones KO para los receptores de IP3 en los astrocitos. En estos ratones los astrocitos no eran activos. En esta condición, las espigas de Ca^{2+} se generaban (Fig.18A), pero en ninguna neurona registrada se consiguió inducir LTP ($69.79 \pm 13.36\%$ del control, $p > 0.05$, $n=3$) (Fig. 18B). También registramos la imagen de Ca^{2+} en los astrocitos, paralelamente al registro electrofisiológico de la neurona, sin observar cambios en la señal (Fig. 21B).

Existe potenciación a largo plazo, de neuronas piramidales de CA1 de hipocampo, dependiente de la liberación de D-serina por parte del astrocito (Rusakov A y cols, 2010). Por consiguiente, nos propusimos investigar si era la liberación de D-serina el gliotransmisor implicado en esta LTP. Después de obtener registros controles en IP3R2-KO en los que no se inducía LTP, perfundimos D-serina en el baño durante el experimento. Bajo esta condición conseguimos obtener LTP ($141.91 \pm 20.77\%$ del control, $p < 0.05$, $n=3$) (Fig. 18B).

Por último nos preguntamos; ¿qué estaba activando a los astrocitos durante nuestro protocolo de estimulación? La elevación de Ca^{2+} en los astrocitos es crucial para inducir potenciación a largo plazo en corteza somatosensorial en ratones *in vivo* (Hirase, 2011), esta LTP descrita es dependiente de la activación de receptores muscarínicos presentes en los astrocitos. Con el propósito de averiguar si ocurría lo mismo en la LTP que estábamos estudiando, lo que hicimos fue registrar imagen de Ca^{2+} en ratones WT en presencia de Atropina (10 μM) en el baño. El resultado en estas condiciones no se diferenciaba del control. Los astrocitos aumentaban su Ca^{2+} intracelular de forma significativa durante la generación del protocolo de inducción (Fig. 19A). Por el contrario, realizando el mismo experimento, pero perfundiendo LY367385 (antagonista de los mGluR1, 50 μM), no veíamos cambios significativos en la señal de Ca^{2+} desde los astrocitos durante la generación del protocolo (Fig. 19B).

Las elevaciones de Ca^{2+} astrocitarias inducidas por estas espigas no se afectaban en presencia de los antagonistas de los M3-AchR. Los responsables de la activación de los astrocitos eran los mGluR1.

7. ¿Podría ser fisiológico este tipo de plasticidad mediada por espigas de Ca^{2+} a baja frecuencia?

Existen neurotransmisores que disminuyen la inhibición localmente, facilitando la generación de espigas de Ca^{2+} . Entre ellos se encuentran, los endocannabinoides, (Maglio y cols, 2015) ó la acetilcolina (Nuñez y cols, 2012). En este trabajo nosotros quisimos probar si en rodajas talamocorticales, donde las aferencias talamocorticales se encuentran mejor preservadas, era posible la generación de espigas de Ca^{2+} sin la necesidad de bloquear la transmisión inhibitoria con PiTX y sin aplicar exógenamente compuestos que redujeran el nivel de inhibición.

La generación de espigas por estimulación eléctrica en ausencia de PiTX en estas rodajas talamocorticales indujo LTP de las sinapsis registradas ($151.23 \pm 4.51\%$, $p < 0.05$, $n=6$) (Fig. 20C). Por último comprobamos que las espigas generadas en estas condiciones fuesen similares a las generadas en presencia de PiTX, para esto bloqueamos con D-APV (50 μM) y Nifedipina (20 μM) durante la generación de las espigas y observamos que estas espigas también dependían de las corrientes mediadas por los NMDARs y los CCDVs, pudiéndolas llamar espigas de Ca^{2+} (Fig. 20D)

Para ello obtuvimos rodajas talamocorticales (*ver materiales y métodos*) y estimulamos en las capas inferiores, capa V_B ó capa VI (Fig. 20A). Aplicábamos el mismo protocolo de estimulación que en rodajas coronales pero en esta ocasión en ausencia de PiTX. La generación de espigas de Ca^{2+} fue exitosa en estas rodajas no des-inhibidas (Fig. 20B).

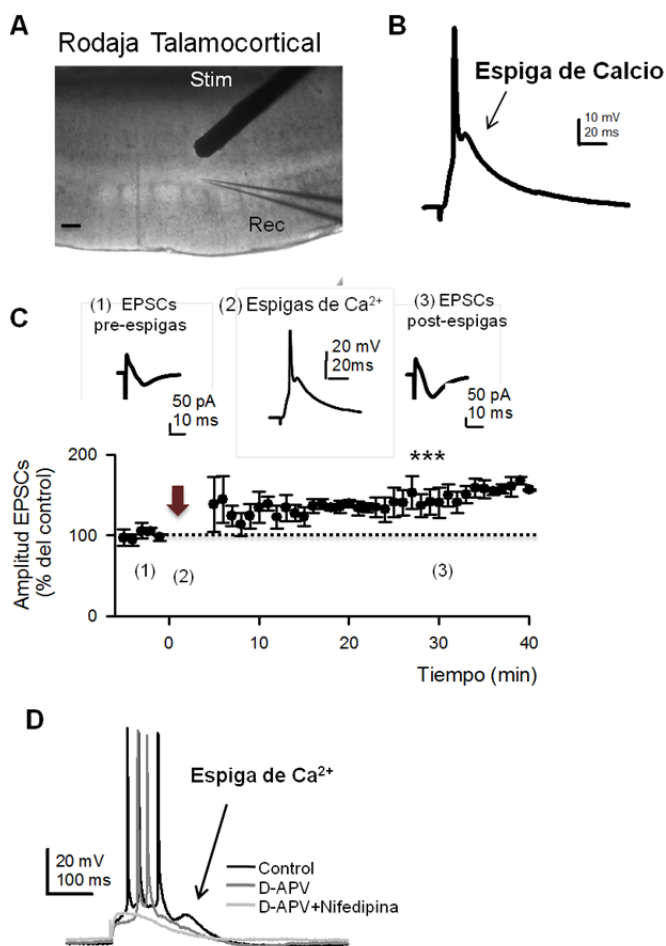


Figura 20. Las espigas de calcio inducen LTP en rodajas tálamo-corticales (Th-Cx) no des-inhibidas.

A, Imagen DIC de una rodaja tálamo-cortical, con el electrodo de registro (Rec) en la capa V_A y el electrodo de estimulación (Stim) en la capa V_B -VI (Barra de calibración 100 μ M). B, Representación del registro de una espiga de calcio en rodajas Th-Cx sin PiTX. C, Representación gráfica de una espiga de Ca^{2+} en rodajas Th-Cx sin PiTX inducida por estimulación de las dendritas de una neurona piramidal de capa V, en condiciones control (trazo negro), en presencia de D-APV (trazo gris oscuro) y en presencia de D-APV + Nifedipina (trazo gris claro). D. Arriba, Representación del registro de la espiga de calcio en rodajas Th-Cx (2) y representación de los EPSCs antes (1) y a los 30 minutos (3) del protocolo de inducción. Abajo, Curso temporal de los cambios en la amplitud de los EPSCs antes (1) y después (3) (como % del control), inducido por las espigas de calcio (2).

Nos preguntamos si en las rodajas talamocorticales, con la inhibición funcionando, podrían estar participando los eCBs en la regulación de la inhibición para posibilitar la generación de las espigas de Ca^{2+} . En los resultados se puede observar, que en las rodajas coronales con la transmisión inhibitoria bloqueada, no se afectaba la inducción de la LTP. Sin embargo, en rodajas talamocorticales, el AM251, bloqueaba la inducción de la LTP por las espigas de Ca^{2+} (Fig. 21). Estos datos apuntan a que en este sistema los eCBs participan modulando la transmisión sináptica inhibitoria, mediada principalmente por los GABA $_A$, ya que en presencia de PiTX el AM251 permite la inducción de la LTP.

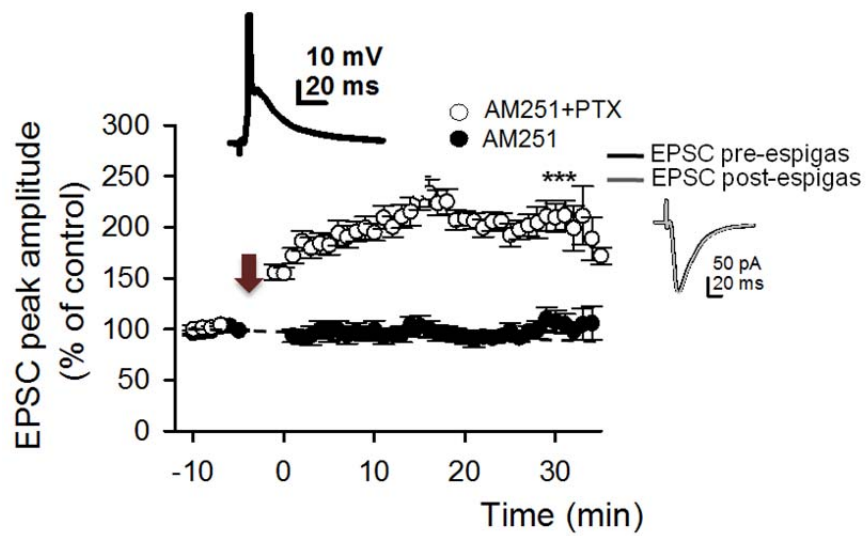


Figura 21. La LTP inducida por espigas de Ca^{2+} en rodajas talamocorticales es dependiente de la liberación de eCBs. En presencia de AM251 las espigas de Ca^{2+} inducen LTP en las rodajas coronales tratadas con PiTX, pero en rodajas talamocroticales sin presencia de PiTX, el AM251 bloquea la inducción de la LTP.

V. DISCUSIÓN

La forma de disparo de las neuronas piramidales (disparos aislados de potenciales de acción o trenes de potenciales de acción) tienen gran importancia a la hora de transmitir información entre unas neuronas y otras y a la hora de desencadenar procesos de plasticidad a corto y largo plazo. Los datos obtenidos presentados en este trabajo demuestran que la estimulación a baja frecuencia de las dendritas basales de las neuronas piramidales de capa V, produce la aparición de espigas de Ca^{2+} . Estas espigas de calcio cuando son precedidas por un EPSP son capaces de inducir LTP de las sinapsis basales excitadoras de estas neuronas. Los resultados obtenidos sugieren que esta forma de LTP es mediada postsinápticamente, requiriendo el incremento de calcio citosólico y la activación de la CAMKinasa tipo II.

En rodajas des-inhibidas la estimulación a $\pm 100 \mu\text{M}$ por debajo del soma, disparaba un EPSP seguido por un PA y una onda lenta con características “todo o nada”, sugiriendo que consiste en una espiga de Ca^{2+} , como se han descrito en neuronas piramidales de capa V. Durante su generación se produce una elevación del Ca^{2+} intracelular y se registran en presencia del bloqueante de corrientes de Na^{2+} (QX134). Además, se reduce de amplitud cuando se inhiben los receptores de NMDA y las corrientes de Ca^{2+} tipo L (Gordon y cols, 2006; Schiller y cols, 2000; Nuñez y cols, 2012). Por este motivo, este tipo de espiga lenta se denominó espiga NMDA (Nevian y cols, 2007; Schiller y cols, 2000).

En nuestros experimentos, la estimulación repetida de las dendritas basales, que evocaba este tipo de respuesta EPSP-PA-espiga de Ca^{2+} , indujo LTP en las neuronas piramidales. Esta LTP era estrictamente dependiente de la espiga de Ca^{2+} porque desaparecía cuando la espiga de Ca^{2+} era inhibida por: 1) la presencia de la transmisión inhibitoria, 2) baja intensidad de estimulación y 3) incrementando la frecuencia de estimulación (5.0 Hz). Además, bloqueando el aumento de Ca^{2+} asociado con la espiga, por medio de un quelante de Ca^{2+} intracelular (BAPTA,) se prevenía la LTP sin inhibición del flujo de Ca^{2+} (espiga de Ca^{2+}). Por consiguiente el incremento intracelular de la concentración de Ca^{2+} mediada por el flujo de Ca^{2+} a través de los NMDARs y los CCVDs es requerido para la inducción de esta LTP.

La secuencia EPSP-PA se produce en los protocolos STDP que también inducen LTP en diferentes sistemas (Markram, 1997; Bi y Poo, 1998). Como ya demostraron Markram y sus colaboradores, la inducción de LTP en las sinapsis excitadoras de las neuronas piramidales de capa V, requiere la asociación entre la actividad presináptica (despolarización de la terminal sináptica y liberación de glutamato) y una fuerte despolarización postsináptica, en un intervalo de tiempo aproximadamente de 20 ms. A este protocolo le llamaron STDP (*spike timing-dependent plasticity*) (Song y cols, 2000) y se realizaba inyectando corriente despolarizante a través de la pipeta de registro, tanto en la neurona post como en la presináptica (apareamiento ó en inglés *pairing*). Sin embargo, nuestro protocolo de inducción, al que hemos llamado STDP-like (*spike timing-dependent plasticity like*), generaba los dos componentes necesarios mediante la aplicación de un único estímulo sináptico, debido a que la espiga de NMDA era la que proporcionaba la despolarización postsináptica.

Para la inducción de esta plasticidad el receptor de NMDA tiene un papel fundamental. La apertura de este receptor, requiere la unión de glutamato y la despolarización postsináptica, permitiendo la entrada de Ca^{2+} (Collingridge y Bliss, 1995). Los resultados presentados aquí demuestran que las espigas de Ca^{2+} no eran capaces por sí solas de generar LTP cuando los NMDARs estaban bloqueados con D-APV, indicando que la activación de los NMDAR y su desbloqueo de Mg^{2+} son absolutamente necesarios para la inducción de LTP por STDP-like. Al contrario, la generación de espigas de Ca^{2+} cuando los NMDARs estaban bloqueados inducía una LTD presináptica. La LTD inducida por STDP dependiente de una baja entrada de Ca^{2+} es postsináptica (Sjostrom y Nelson, 2002), de este modo nuestra LTD podría deberse a una LTD dependiente de eCBs liberados desde la neurona piramidal (Nevian y Sakman, 2006). Las espigas de Ca^{2+} en presencia de D-APV inducían LTD, sin embargo esta LTD es presináptica debido a que cambiaba su PPR y en presencia de bloqueantes de NMDARs exclusivamente en la neurona postsináptica (MK801 en el electrodo de registro) no era inducida. Estos resultados podrían sugerir que en situación control no ocurría la LTD debido a la coactivación de los NMDAR por glutamato, mientras que, con los NMDARs bloqueados si se observaba esta LTD presináptica, por lo tanto podríamos indicar que la LTD que observamos en D-APV no es por STDP.

El sitio de generación de la LTP puede ser pre- o postsináptico; la LTP puede expresarse como un aumento en el número y/o un incremento en la conductancia iónica unitaria de receptores funcionales de AMPA (Malenka y Bear, 2004; Collingridge

y cols, 2004), o por un aumento de la sensibilidad de los AMPARs al glutamato liberado (Malinow y Malenka, 2002). Sin embargo, también existen mecanismos presinápticos como son, el aumento en la probabilidad de liberación o aumento en la cantidad de glutamato liberado, que pueden ser responsables de una potenciación en la transmisión sináptica excitadora (Cabezas y Buño, 2006). Los resultados muestran que en este caso la expresión de la LTP era exclusivamente por cambios postsinápticos, sin contribución significativa de cambios en las terminales presinápticas. Tanto el análisis de la facilitación por pares de pulsos, como la distribución del coeficiente de variación y los registros de corrientes generadas por puff de glutamato indican que no hay cambios en la probabilidad de liberación en la LTP inducida por STDP-like.

Durante la STDP-like se producía una potenciación tanto de las corrientes mediadas por los AMPARs como de las mediadas por los NMDARs, proporcionando un refuerzo/aumento en las corrientes mediadas por estos dos receptores cuando se liberaba glutamato desde la terminal presináptica. Un aumento de los dos componentes está descrito en el hipocampo, donde la Ach potencia a largo plazo; el componente AMPA, por nueva inserción de estos receptores en la membrana postsináptica y el componente NMDA, por aumento de su conductancia unitaria (FdZ De Sevilla y Buño, 2010). Con estos datos deducimos que STDP-like proporciona una potenciación de las corrientes excitadoras de manera muy eficaz, ya que se reforzaban las corrientes mediadas tanto por AMPARs como por NMDARs.

La despolarización sináptica, como la que produce la espiga de NMDA, tiene un papel fundamental en los procesos de plasticidad. El descubrimiento de la retropropagación de potenciales de acción de Na^+ por el árbol dendrítico de neuronas piramidales, de corteza e hipocampo (Spruston y cols, 1995; Stuart y cols, 1997), proporciona el evento despolarizante postsináptico determinante para la inducción de la plasticidad Hebbiana. Trabajos anteriores realizados en neocorteza e hipocampo han demostrado que protocolos de STDP, en los cuales el potencial de acción (PA) es evocado justo después de un EPSP, dan lugar a potenciación a largo plazo, mientras que si ocurre al revés se induce LTD (Markram y cols, 1997, Bi y Poo, 1998), por tanto, el patrón temporal en el que deben ocurrir ambos acontecimientos (potencial sináptico y PA) es fundamental para la generación de STDP. Sin embargo, el apareamiento de EPSP-PA con un único PA en las neuronas piramidales de capa V es inefectivo para inducir LTP (Kampa y cols, 2006), un único PA atenúa y falla al propagarse retrógradamente hasta algunas dendritas en estas neuronas piramidales (Stuart y cols, 1997). No obstante, la generación de un tren de PAs sobre el EPSP, impulsa la

propagación retrógrada y este apareamiento de EPSP-tren de PAs era capaz de inducir LTP (Kampa y Stuart, 2006). Está bien descrito que las neuronas piramidales de capa V pueden disparar ráfagas de PAs (Larkum y cols, 1999) y que estas ráfagas podrían ser una clave importante para la codificación de la información sensorial por sus propiedades de retropropagación por el árbol dendrítico (Lisman, 1997). Nuestros experimentos muestran que estas neuronas no inducían LTP cuando el apareamiento se producía entre el EPSP y uno o dos PAs, era necesario apareamiento del EPSP con 3 PAs. Por lo tanto, podríamos deducir que esta LTP necesita una mayor entrada despolarizante, la cual se alcanza con al menos tres PAs. La necesidad de una mayor despolarización podría ser debido a la menor constante de espacio (λ) de estas neuronas piramidales de capa V, necesitando una mayor despolarización para que la retropropagación del PA alcance las dendritas basales y pueda inducirse esta LTP Hebbiana.

En rodajas des-inhibidas el bloqueo de la conductancia del Na^+ con QX-314 bloqueaba la inducción de la LTP, indicando el requerimiento de las conductancias para Na^+ en la generación de la LTP mediada por STDP-like. Además, la inhibición de los NMDARs y/o de los CCVDs causaba una fuerte reducción de la amplitud de la espiga de Ca^{2+} . La co-activación de NMDAR y CCVD permite un flujo de Ca^{2+} supralinear que puede contribuir efectivamente a la generación de la LTP (Yuste y cols, 2000; Nevian y Sakmann, 2004; Remy y Spruston, 2007). Una serie de experimentos demuestran que la sumación supralinear de Ca^{2+} depende de la interacción entre el EPSP y el PA retropropagado (Yuste y Denk, 1995; Schiller y cols, 1998). Este aumento transitorio de Ca^{2+} en la espina dendrítica es capaz de activar una serie de rutas bioquímicas intracelulares que desencadenan la LTP (Malenka y Nicoll, 1998; Malenka y Bear, 2004). El flujo de calcio a través de los receptores NMDA y CCVD de tipo-L durante la espiga de calcio impulsa la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares sensibles para Rianodina en el retículo endoplasmático (RE) que son necesarios para la generación de esta forma de LTP. Además la activación de receptores metabotrópicos de glutamato de tipo 1 (mGluR1), proteínas G y PLC son necesarios para la inducción de la LTP y esto justifica el aumento requerido de IP_3 citosólico, con el fin de activar IP_3Rs durante la generación de las espigas de calcio. Está bien descrito que la LTP mediada por la activación de los receptores IP_3 (LTP_{IP_3}) en hipocampo, es una LTP postsináptica independiente de la activación de los NMDARs y mediada por la activación de los M1-AchRs (Fdez De Sevilla y cols, 2008).

Los mAChRs de tipo M1 y los de tipo M3 están acoplados a PLC, y a través de proteínas Gq hidrolizan a moléculas de fosfatidilinositol bifosfato dando lugar a

diacilglicerol (DAG) e IP_3 (Abe y cols, 1992). El IP_3 generado activa receptores sensibles para IP_3 y provoca la liberación de Ca^{2+} desde reservorios del RE sensibles a IP_3 (Power y Sah, 2002). La activación de M1-AchRs y la liberación de Ca^{2+} desde reservorios del RE sensibles a IP_3 inducen LTP (LTP_{IP_3}). Estos aumentos de Ca^{2+} producen un aumento de inserción de AMPARs en la espina dendrítica (Fdez De Sevilla y cols, 2008). Sin embargo, en nuestros resultados aunque era necesaria la activación de las proteínas Gq y de la PLC, no existía sensibilidad a la activación de los M1-AchRs. No obstante, demostramos que en presencia de los M3-AchRs y mGluR1s bloqueados se inhibía la inducción de la LTP. Estos resultados indican que la ruta intracelular activada es también dependiente de las proteínas Gq y la PLC pero en este caso por medio de los M3-AchRs y mGluR1.

Un gran número de moléculas de transducción de señales han sido sugeridas para explicar el papel de la señal de Ca^{2+} en el aumento de la fuerza sináptica requerida para desencadenar la LTP. Entre ellas están la CaMKII, PKA, PKC o MAPK (Malenka y Bear, 2004). Por lo tanto, los mecanismos celulares que subyacen a la expresión de esta LTP han sido determinados mediante la aplicación de drogas que bloquean específicamente estas proteínas Kinasas. Un incremento alto de Ca^{2+} en la espina dendrítica aumenta la afinidad del Ca^{2+} por la Calmodulina (CaM) y se unen formando el complejo Ca-CaM. Este complejo activa a la CaMKII. La CaMKII es un enzima que tiene la propiedad de autofosforilarse y así mantener su actividad una vez el Ca^{2+} intracelular baja a niveles basales (Lisman, 1994; Malenka, Nicoll y Malinow, 1997). Este enzima participa en la LTP fosforilando a AMPARs ya presentes en la superficie sináptica y aumenta la conductancia unitaria de estos canales. También se postula que la CaMKII remueve receptores AMPA que están situados en otras zonas hasta la membrana plasmática de la sinapsis en la espina dendrítica (Malenka y Nicoll, 1999). En nuestros resultados se observa que la inhibición de la CaMKII con AIP bloquea la LTP. Estos resultados señalan que esta LTP postsináptica es mediada por un aumento de la conductancia unitaria de los AMPARs y posiblemente una movilización de un mayor número de AMPARs a la membrana postsináptica de la sinapsis. La potenciación de las corrientes mediadas por NMDARs también es dependiente de la activación de la CaMKII. Por lo tanto nuestros datos también indican un aumento en la conductancia unitaria y/o una inserción de receptores NMDA en la densidad postsináptica.

Está bien establecido que, como todos los procesos biológicos duraderos, la LTP requiere la síntesis de nuevas proteínas y la transcripción de genes. Algunas de las moléculas descritas para esta función son, PKA, CaMKIV y MAPK, las cuales

activan factores de transcripción como CREB (Malenka y Bear, 2004). En nuestros resultados se puede comprobar que la proteína Kinasa A (PKA) estaba participando en la expresión de la LTP, debido a que su inhibición con H89 dihydrochloride bloqueaba por completo la potenciación de los EPSCs. Trabajos publicados en registros realizados en hipocampo describen que la síntesis de nuevos AMPARs mediada por PKA es incrementada aproximadamente a las tres horas después de la inducción de la LTP (Asha y cols, 1998). Nuestros resultados muestran un curso temporal menor de tres horas, con lo que el efecto de la PKA que observábamos no se debía a inserciones de nuevos AMPARs. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la PKA podría estar actuando impulsando la actividad de la CaMKII indirectamente, mediante la disminución de la actividad de proteínas fosfatasas (Blitzer y cols, 1998). Nos preguntamos que podría estar activando a la PKA, ya que la PKA se activa por aumentos de AMP_C. El aumento de AMP_C es debido a la activación de la enzima Adenil-ciclasa a través de activación de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gs (*ver introducción; Receptores de glutamato*) y/o por una vía de activación dependiente de la Calcio-calmodulina (Somogyi y cols, 2011). En nuestros experimentos la inducción de la LTP no es sensible a receptores acoplados a proteínas Gs. Por estos datos sugerimos que la PKA se activa a través de grandes aumentos de Ca²⁺ que activan a la Calcio-Calmodulina.

Estos resultados en conjunto sugieren que un gran aumento de Ca²⁺ en el interior de la espina dendrítica dependiente de las espigas de Ca²⁺, deja la activación de cascadas de señales intracelulares implicando a varias proteínas Kinasas; la CaMKII y la PKA. Esta activación provocaría un incremento en la conductancia unitaria de los NMDARs y AMPARs y podría promover la incorporación adicional de AMPARs y/o NMDARs en la densidad postsináptica.

En multitud de trabajos recientes se describen procesos de plasticidad sináptica dependiente de la activación de astrocitos (*ver introducción; Astrocitos y plasticidad sináptica*). En nuestros resultados observamos la necesidad de la activación de M3-AchRs y mGluR1s, ambos acoplados a la misma ruta intracelular (proteínas Gq, PLC...), por lo que nos preguntamos si alguno de estos receptores era requerido para la activación de los astrocitos. Lo primero que realizamos fue bloquear la red astrocitaria mediante fluorocitrato de bario o por llenado de la red con BAPTA. En estas dos condiciones la LTP no se inducía, al igual que ocurría en ratones IP3R2-KO para astrocitos. Estos resultados nos aseguran que la actividad del astrocito era crucial para esta LTP. La LTP generada por estimulación a alta frecuencia (HFS) de las células piramidales de CA1 en hipocampo *in vitro* depende, al menos en parte, del

incremento de Ca^{2+} en los astrocitos y de la subsecuente liberación de D-serina (Henneberger y cols, 2010; Navarrete y cols, 2013), al igual que la LTP descrita en corteza *in vivo* por protocolos de apareamiento (Takaka y cols, 2011). En el modelo de ratones IP3R2-KO, realizamos el protocolo de estimulación STDP-like en presencia de D-serina exógena y se inducía LTP. Esto nos indica que la liberación de D-serina estaba participando en la inducción la LTP por STDP-like. Los astrocitos son células no excitables eléctricamente, son excitables por receptores metabotrópicos (*ver introducción; Astrocitos y plasticidad sináptica*). Por tanto, lo siguiente fue estudiar el posible mecanismo responsable de esta activación de los astrocitos para la liberación de D-serina. Para ello realizamos el protocolo en presencia de antagonistas para los receptores metabotrópicos implicados en esta LTP: mGluR1s y M3-AchRs. En los resultados observamos que en presencia de los mGluR1s bloqueados los astrocitos disminuían sus aumentos de Ca^{2+} con respecto al control. Por el contrario, en presencia de los M3-AchRs bloqueados no existieron cambios significativos en los aumentos de Ca^{2+} en los astrocitos. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la liberación de D-serina desde los astrocitos era mediada por la activación de los mGluR1s. De este modo, lo más plausible sería pensar que el mecanismo subyacente a esta forma de LTP implicaría la activación de los astrocitos por medio del neurotransmisor glutamato. El glutamato provocaría un aumento de Ca^{2+} en el astrocito y este liberaría D-serina que actuaría postsinápticamente, a nivel de los receptores NMDA (Panatier y cols; 2006).

La Ach juega un papel importante en la plasticidad de la corteza cerebral, de hecho la combinación de la estimulación de las vibrisas y del núcleo colinérgico basal de Meynert (NMB) induce LTP en la corteza somatosensorial de ratas y gatos (Metherate y cols, 1987; Takaka, 2011; Barros-Zulaica y cols, 2014) y la aplicación de Ach en registros de célula única en rodajas de rata también induce LTP en neuronas de esta corteza somestésica (Nuñez y cols, 2012). La LTP descrita en corteza somatosensorial en rata *in vivo* es dependiente de la activación de receptores mAChR en astrocitos (Takaka y cols, 2011). En nuestros resultados la activación de los astrocitos es mediada por el subtipo mGluR1. Con el conjunto de todos los datos obtenidos, interpretamos que en esta forma de LTP, mediada por STDP-like, los receptores M3-mAChR serían activados a nivel de la neurona postsináptica y con ello la cascada de señales intracelulares necesaria, descrita anteriormente (activación Proteína Gq, PLC, IP3...). Con respecto a los mGluR1, estos receptores mediarían la activación de los astrocitos, provocando un aumento de calcio y la consecuente liberación de D-serina, coactivador de los NMDARs, crucial para la LTP. Esta LTP

difiere a la descrita *in vivo* (Takaka y cols, 2011) en el subtipo de receptor colinérgico, pero los resultados sugieren una LTP similar a la descrita *in vivo*.

Nuestros resultados muestran que la des-inhibición por bloqueo de los GABA_ARs facilita la generación de espigas de Ca²⁺ y la LTP. En cambio, en rodajas talamocorticales, donde tenemos mejor preservadas las aferencias glutamatérgicas procedentes del tálamo, observamos que la generación de estas espigas de Ca²⁺ era posible sin la necesidad de bloquear la transmisión sináptica inhibitoria y en estas condiciones inducían LTP. En estas condiciones la inhibición de los CB₁Rs bloqueaba la inducción de la LTP sugiriendo un papel importante de los eCBs en la regulación de la inhibición, que estaría interviniendo en esta LTP, y por lo tanto podrían tener un papel importante en esta LTP en condiciones más naturales. De este modo las interacciones excitadoras que facilitan las espigas de Ca²⁺ en la capa V podrían ser bloqueadas por reducción de la excitación o incremento de la inhibición, sugiriendo que el circuito de interacción entre excitación-inhibición juega un papel importante en la inducción de esta LTP. Posiblemente la espiga de Ca²⁺ y la LTP podrían ser inducidas por inhibición GABAérgica presináptica a través de la activación de los CB₁Rs. Los eCBs podrían ser liberados retrógradamente desde la neurona piramidal despolarizada (Kano y cols, 2009), mediada por la espiga de Ca²⁺. Mostramos que en rodajas talamocorticales con la transmisión inhibitoria intacta, los antagonistas de los CBR₁s (AM251) bloquean la LTP, sin embargo en las rodajas con presencia de PiTX (inhibición bloqueada parcialmente) el AM251 no afecta a la LTP. CB₁R está presente preferentemente en interneuronas, más que en neuronas excitadoras, en las que su expresión es considerablemente más baja. Por ejemplo, las células en cesto que expresan colecistoquinina (CCK) del hipocampo y la corteza cerebral, las células granulares e interneuronas inhibitorias de la corteza cerebelosa y las neuronas espinosas de tamaño medio del estriado tienen una expresión abundante de CB₁R (Kano y cols, 2009). Por lo tanto, la densidad de CB₁Rs es más elevada en las sinapsis inhibitorias que en las excitadoras (Bodor y cols, 2005), por este motivo y con nuestros resultados, podríamos deducir que los eCBs están actuando en este sistema a través de regular la inhibición.

Estos datos pueden sugerir un papel de la señal retrógrada de los eCBs en la regulación del umbral de la espiga de Ca²⁺ y esta LTP en condiciones fisiológicas. Interesantemente la reducción de la inhibición mediante la activación de mAChRs por aplicación de Ach, evoca en las neuronas piramidales de capa V una respuesta similar de EPSP-espiga de Ca²⁺, sugiriendo una actividad local que puede contribuir en el control de la inducción de la LTP (Nuñez y cols, 2012).

La presencia de espigas de Ca^{2+} tiene importantes implicaciones funcionales, como demuestra este trabajo. Este tipo de descarga también se puede observar *in vivo*. Un único estímulo presináptico puede generar en las neuronas piramidales un tren de PAs (de Kock y Sakmann, 2008). Este tipo de respuestas en las neuronas piramidales por las espigas de Ca^{2+} , podría ser un mecanismo de modulación que estaría interviniendo en la amplificación de señales procedentes de la estimulación de las vibrisas durante el reconocimiento de objetos. Interesantemente la actividad dendrítica y la retropropagación de los PAs están aumentados cuando el animal está despierto (Larkum, 2009), sugiriendo un papel activo en la función sensorial dependiendo del grado de activación del animal. Esta modulación se debe al balance excitación-inhibición que está cambiando constantemente en las neuronas por el grado de alerta, mecanismos atencionales o durante el ciclo vigilia-sueño. En nuestro caso, la estimulación sináptica que genera LTP se produce cuando se aplica a baja frecuencia mientras que en otros casos se puede producir por estimulación de las vibrisas a frecuencias más altas (4-12 Hz) utilizadas por los roedores para explorar el ambiente (Megevand y cols, 2009; Barros-Zulaica y cols, 2014). La estimulación tetánica de la capa IV produce una LTP en las neuronas de capa II/III que puede durar horas (Glazewski y cols, 1998), sugiriendo que la corteza somestésica puede tener diferentes mecanismos de facilitación de las respuestas sensoriales dependiendo del tipo y la frecuencia de la estimulación. Los roedores mueven las vibrisas a diferentes frecuencias dependiendo del tipo de exploración que están realizando (Moore, 2004). Además, los procesos de plasticidad sensorial mediados por activación de receptores del tipo NMDA pueden ser cruciales en la generación de conexiones sinápticas en animales neonatos y durante el desarrollo de la vía somatosensorial (Borgdorff y cols, 2007; An y cols, 2012). Por tanto, la presencia de espigas de Ca^{2+} y su activación en determinadas situaciones podría tener una implicación importante para modular las repuestas de las neuronas piramidales de la corteza somestésica que codifican la información espacial crítica y vital para el comportamiento de los animales en su entorno.

El aprendizaje es el proceso por el que adquirimos el conocimiento sobre el mundo, mientras que la memoria es el proceso por el que el conocimiento es codificado, almacenado, consolidado y posteriormente recuperado. El aprendizaje y la memoria son procesos íntimamente relacionados. No se consigue separar el aprendizaje de la memoria, ni resulta posible realizar esta distinción dentro del circuito neuronal. La medida de lo aprendido se relaciona con la memoria, siendo ésta la expresión de la capacidad de recuperar informaciones adquiridas. Dado que no se

producen grandes cambios en el número de neuronas a lo largo de la vida, las sinapsis parecen constituir el sitio físico en el que se realizan los cambios necesarios para éstos procesos de aprendizaje y memoria (Ortega y Franco, 2010). En nuestros resultados demostramos que las espigas de Ca^{2+} realizan cambios a nivel de la eficacia de las sinapsis y su aparición depende de un balance entre excitación e inhibición. Con lo que nos lleva a pensar que esta propiedad de las neuronas podría estar participando en los mecanismos de plasticidad sináptica involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria por los que los organismos modifican su conducta para adaptarse a las condiciones cambiantes del medio que nos rodea. Este proceso es continuo durante el desarrollo y en la edad adulta.

VI. CONCLUSIONES

1. Las espigas de calcio generadas en neuronas piramidales de capa V en corteza somatosensorial primaria (corteza de barriles) inducen LTP de las sinapsis excitadoras basales. Se induce LTP de las corrientes mediadas por AMPAR y de las corrientes mediadas por NMDAR.
2. Estas espigas de calcio son mediadas por la activación de NMDAR y CCVD, siendo la LTP inducida por ellas también dependiente de su activación.
3. Esta LTP precisa de aumentos de calcio citosólicos provenientes del exterior celular por los receptores mencionados en el punto anterior y por la liberación de calcio desde los reservorios intracelulares dependientes de la activación de IP3R Y RianodinaR.
4. Esta LTP mediada por espigas de calcio puede inducirse sin necesidad de bloquear la transmisión sináptica inhibitoria.
5. En condiciones con la transmisión sináptica inhibitoria funcionando esta LTP depende de la activación de CBR1, ya que se bloquea en presencia de AM251.
6. El mecanismo que subyace a esta LTP mediada por espigas de calcio es exclusivamente postsináptico, con la movilización de rutas intracelulares en las que está implicada la activación de la PKA y la CaMKII.
7. La LTP mediada por espigas de calcio requiere la colaboración de los astrocitos mediante liberación de D-serina. Esta LTP necesita la activación de los M3-mAChR en la neurona piramidal y la activación de los mGluR1 en el astrocito.

Alloway KD. Information processing streams in rodent barrel cortex: the differential functions of barrel and septal circuits. *Cereb Cortex* 18:979-989

Araque A y Buño W. Fast, persistent, Ca^{2+} -dependent K^+ current controls graded electrical activity in crayfish muscle. *Pflügers Arch* 1995, 430:541-51

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 1999, 22:208-215

Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG. Snare protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 2000, 15;20(2):666-673

Araque, A, Carmignoto, G, Haydon PG. Dynamic signaling between neurons and glia. *Annu Rev Physiol* 2001, 63:795-813

Araque A, Martin, ED, Perea G, Arellano JI, Buño W. Synaptically released acetylcholine evokes Ca^{2+} elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 2002, 22:2443-2450

Artola A, Singer W. Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation. *Trends Neurosci Rev* 1993, 16:480-7

Asha N, Devon JZ, Ronald L, Nancy RZ, Michael DB. Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. *Nature* 1998, 394:680-82

Bekkers JM. Distribution of slow AHP channels on hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2000, 83:1756-9

Bender VA, Bender KJ, Brasier DJ, Feldman DE. Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J Neurosci* 2006, 26:4166-77

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973, 232:331-335

Blitzer RD, Connor JH, Brown GP, Wong T, Shenolikar S, Iyengar R y Landau EM. Gating of CaMKII by cAMP-Regulated Protein Phosphatase Activity During LTP. *Science* 1998, 280

Bodor AL, Katona I, Nyíri G, Mackie K, Ledent C, Hájos N, Freund TF. 2005. Endocannabinoid signaling in rat somatosensory cortex: laminar differences and involvement of specific interneuron types. *J Neurosci*. 25(29): 6845-685

Bonhoeffer T, Yuste R. Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron* 2002, 12;35(6):1019-27

Chevalleyre, V, Castillo PE. Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron* 2003, 38:461–472.

Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions and mechanisms. *Neuropharmacology* 2008, 55:18-41.

Collingridge GL, Bliss TV. Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* 1995, 18:54-6

Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol* 1997, 37:205-237

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999, 51:7-61

Dan Y, Poo MM. Spike-timing dependent plasticity: from synapse to perception. *Physiol. Rev* 2006, 86:1033-48

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 1995, 48(3):443-450

Feldman DE. Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron* 2000, 27:45-56

Fernandez de Sevilla D, Fuenzalida M, Porto Pazos AB, Buño W. Selective shunting of the NMDA EPSP component by the slow afterhyperpolarization in rat CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2007, 97:3242–3255

Fox K. *Barrel Cortex*. New York: Cambridge University Press 2008

Hassel B, Paulson RE, Johnsen A, Fonnum. Selective inhibition of glia cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* 1992, 576:120-124

Haines D. *Principios de Neurociencia*. Madrid: Elsevier Science 2006

Hebb D. *The Organization of Behaviour*. New York: John Wiley 1949

Hoeflinger B, Bennett-Clarke C, Chiaia N, Killackey H, Rhoades R. 1995. Patterning of local intracortical projections within the vibrissae representation of rat primary somatosensory cortex. *J Comp Neurol* 1995, 354:551—563

Hoffer ZS, Arantes H, Roth R, Alloway KD. Functional circuits mediating sensorimotor integration: quantitative comparisons of projections from rodent barrel cortex to M1 cortex, neostriatum, superior colliculus, and pons. *J Comp Neurol* 2005, 488:82--100

Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D. K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 1997, 387:869-75

Kampa BM, Stuart GJ. Calcium spikes in basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons during action potential bursts. *J Neurosci* 2006, 26:7424-32

Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 2009, 89:309-380

Kelso SR, Ganong AH, Brown TH. Hebbian synapses in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83:5326-30

Koester HJ, Sakmann B. Calcium dynamics in single spines during coincident pre- and postsynaptic activity depend on relative timing of back-propagating action potentials and subthreshold excitatory postsynaptic potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:9596-601

Larkum ME, Watanabe S, Nakamura T, Lasser-Ross N, Ross WN. Synaptically activated Ca²⁺ waves in layer II/III and layer V rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 2003, 549(2):471-488

Larkum ME, Zhu JJ, Sakmann B. Dendritic mechanisms underlying the coupling of the dendritic with the axonal action potential initiation zone of adult rat layer 5 pyramidal neurons. *J Physiol* 2001, 533.2:447-466

Larkum ME, Zhu JJ. Signaling of layer 1 and whisker-evoked Ca²⁺ and Na⁺ action potentials in distal and terminal dendrites of rat neocortical pyramidal neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci* 2002, 15;22 (16):6991-7005

Lisman J, Spruston N. Postsynaptic depolarization requirements for LTP and LTD: a critique of spike-timing-dependent plasticity. *Nat Neurosci* 2005, 8:839-41

Lu SM, Lin RC. Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light and electron-microscopic study using Phaseolus vulgaris leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens Mot Res* 1993, 10:1—16

McNaughton BL, Douglas RM, Goddard GV. Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents. *Brain Res* 1978, 157:277-93

Malenka RC, Kauer JA, Zucker RS, and Nicoll RA. Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission. *Science* 1988, 242:81–84

Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation-a decade of progress. *Science* 1999, 285:1870-4

Malenka RC. The long-term potential of LTP. *Nat Rev Neurosci* 2003, 4 (11):923-926

Malinow R, Malenka RC. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity *Annu Rev Neurosci* 2002, 25:103-26

Markram H, Lubke J, Frotscher, M, Sakmann B. Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 1997, 275:213–215

Matsuzaki M, Honkura N, Ellies-Davies GC, Kasai H. Structural basis of long term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 2004, 429: 761-766

Mountcastle VB. The columnar organization of the neocortex. *Brain* 1997, 120, 701–722

Murphy SN, Miller RJ. Two Distinct Quisqualate Receptors Regulate Calcium Homeostasis in Hippocampal Neurons In Vitro. *Molecular Pharmacol* 1989, 35:671-680.

Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain functions. *Science* 1992, 258:597-603

Navarrete M, Araque A. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron* 2008, 27;57(6):883-893

Navarrete M, Araque A. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron* 2010, 68:113-126.

Navarrete M, Perea G, Fernández de Sevilla D, Gómez-Gonzalo M, Núñez A, Martín ED, Araque A. Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol* 2012, 10(2): e1001259

Nevian T, Sakmann B. Spine Ca^{2+} signaling in spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci* 2006, 26(43): 11001-11013

Núñez A, Dominguez S, Buño W, Fernández de Sevilla D. Cholinergic-mediated response enhancement in barrel cortex layer V pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2012, 108(6):1656-1668

Nusser Z, Luján R, Laube G, Roberts JDB, Molnar E, Somogyi P. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 1998, 21:545-549

Ormond J, Woodin MA. Disinhibition-mediated LTP in the hippocampus is synapse specific. *Front Cell Neurosci* 2011, 5:17

Perea G, Araque A. New information pathways in the nervous system: communication between astrocytes and neurons. *Rev Neurol* 2003, 16:31-36

Perea G, Araque A. 2010. GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev.* 63 (1-2): 93-102

Perea G, Araque A. Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal. *J Neural Transm* 2005, 112(1):127-135

Perea G, Araque A. Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 2007, 24:317(5841):1083-6

Petersen C. 2007. The functional organization of the barrel cortex. *Neuron.* 56: 339-355

Pin JP, Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol* 1995, 34:1-26

Power JM, Sah P. Nuclear calcium signaling evoked by cholinergic stimulation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 2002, 22:3454-3462

Pouchelon G, Frangeul L, Rijli FM, Jabaudon D. Patterning of pre-thalamic somatosensory pathways. *Eur J Neurosci* 2012, 35: 1533-1539

Purves D, y cols. Synaptic plasticity. In: Purves, D, Augustine G J, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamantia, AS, White LE. *Neuroscience*. Massachusetts, EE.UU Sinauer 2012, 163-185

Rall W. Distinguishing theoretical synaptic potentials computed for different soma-dendritic distributions of synaptic input. *J Neurophysiol* 1967, 30:1138-68

Remy S, Spruston N. Dendritic spikes induce single-burst long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 23;104(43):17192-17297

Sastry BR, Goh JW, Auyeung A. Associative induction of posttetanic and long-term potentiation in CA1 neurons of rat hippocampus. *Science* 1986, 232:900-988

Schwartzkroin PA, Wester K. Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in their vitro hippocampal slice. *Brain Res* 1975, 89:107-19

Schiller J, Schiller Y, Stuart G, Sakmann B. 1997. Calcium action potentials restricted to distal apical dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol.* 505.3: 606-616

Silva, LR, Amitai Y, Connors, BW. Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* 1991, 251, 432-435

Spruston N, Jaffe DB, Johnston D. Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: the role of passive membrane properties. *Trends Neurosci* 1994, 17:161-6

Spruston N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 2008, 9:206-221

Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Oishi H, Takada M. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci* 1997, 17:7503-7522

Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron* 2003, 39:641-54

Stuart GJ, Sakmann B. Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* 1994, 367:69-72

Stuart G, Schiller J, Sakmann B. Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol* 1997, 505:617-32

Takahashi T, Svoboda K, Mainlow R. Experience strengthening transmission by driving AMPA receptors into synapses. *Science* 2003, 299:1585-1588

Talbot WH, Darian-Smith I, Kornhuber HH, Mountcastle VB. The sense of flutter-vibration: comparison of the human capacity with response patterns of mechanoreceptive afferents from the monkey hand. *J. Neurophysiol* 1968, 31:301-334

Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N, Shigemoto R. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neurosci* 2001, 106:481-503

Valverde, F. Estructuración de la corteza cerebral: organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Rev Neurol* 2002, 34:758-780

Vallbo ÅB, Olsson KÅ, Westberg KG, Clark FJ. Microstimulation of single tactile afferents from the human hand: sensory attributes related to unit type and properties of receptive fields. *Brain* 1984, 107:727-749

Veinante P, Lavalie P, Deschenes M. Corticothalamic projections from layer 5 of the vibrissa barrel cortex in the rat. *J Comp Neurol* 2000, 424:197-204

Volterra A, Bezzi P. The Tripartite Synapse: Glia in synaptic transmission. P.G. Oxford University. Press 2002, New York. 164-184

Wallace MJ, Blair RE, Falenski KW, Martin BR, DeLorenzo RJ. The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 307:129—137

Watanabe S, Hoffman DA, Migliore M, Johnston D. Dendritic K⁺ channels contribute to spike-timing-dependent long-term potentiation in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:8366-71

Watkins JC, Evans RH. Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1981, 21:165-204

Welker C. Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of the rat. *J Comp Neurol* 1976, 166:173—190

Williams SR, Stuart GJ. Backpropagation of physiological spike trains in neocortical pyramidal neurons: implications for temporal coding in dendrites. *J Neurosci* 2000, 20:8238-46

Wilson RI, Nicoll RA. 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*. 29;410(6828):588-92.

Woolsey TA, Van der Loos H. 1970. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res*. 17:205--242

Yuste R, Denk W. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 1995, 375:682-4.